

Tesis Doctoral

PAPEL DE SHP-1 EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA Y SU IMPLICACIÓN EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Ana González Corpas



Universidad
de Alcalá

Doctorado en Señalización Celular
2020

A mi madre, a mi padre y a Mara

Agradecimientos

Lo bueno de tardar tanto tiempo en terminar la tesis es toda la gente con la que te cruzas dentro y fuera del laboratorio, y ahora ha llegado el momento de agradecerlo. En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis el Dr. Santiago Ropero y la Dra. Begoña Colás por todos estos años, por hacerme un hueco en vuestro laboratorio y por luchar por conseguir financiación. Gracias por vuestra paciencia y apoyo durante todo este tiempo, incluso ahora que estoy más lejos sé que puedo seguir contando con vosotros.

Gracias al departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá, en especial a la Dra. Pilar López-Ruiz porque sin ella seguramente la bioquímica habría pasado por mi vida sin pena ni gloria, pero tras varias convocatorias.... ¡Me piqué! Al Dr. Antonio Chiloeches porque siempre ha estado ahí para hacerme pensar, para tomarnos unas cervezas o para lo que hiciera falta. Al Dr. Antonio Jiménez Ruiz por dejarme utilizar sus equipos y hacerme sentir siempre bienvenida en su laboratorio. A la Dra. María José Toro por ser tan genial y auténtica. Muchas gracias también a los Dres. Manuel Puyol, Federico Gago, Ángeles Bernardo, Marina Lasa y Javier de Lucio.

A todos los compañeros con los que he coincidido en estos años Pablo, Irene, David, Nadia, Bea, Alicia, Cecilia, Patri, Raúl, Irene, Ariel, Kilian, Eva, Carlos Mario, Héctor, Claire y Juan, gracias por los buenos momentos. Y en especial a Cris, Miguel, Eva y Chusi, muchas gracias, sin vosotros no habría sido lo mismo. A todos los estudiantes que han pasado por el laboratorio y nos han hecho el trabajo más fácil. A las de fisio, sois geniales, siempre sabíais sacarme una sonrisa. Y no puedo olvidarme de las horas con Isa y Cris en el citómetro y el confocal, y de Pilar y Olga, con lo que me habéis aguantado... siempre llamando por las cuantitas jeje. Muchas gracias a todos.

Como ya he dicho, son muchos años y probablemente esto no habría llegado a su fin sin el apoyo de mis compis del CNIO, empezando por el "Epigenetic team", liderado por la Dra. María J Barrero; seguido por "Leiro's lab", con el Dr. Rafa F. Leiro como principal motivador; y acabando con "Llorca's lab", con el Dr. Oscar Llorca a la cabeza y el resto del departamento de Biología Estructural. ¡Muchas gracias a todos!

Agradecimientos

También tengo que agradecer a tod@s mis amig@s que me han sufrido durante todo este tiempo. Sobre todo a las de toda la vida, a los coñazopanchitadas, a las plimis y a los plimos barrucanos, no me puedo creer que esto se acabe!!

Por último, quisiera agradecer a mi familia, sobre todo a mis padres y a Mara que son los que más me han aguantado y apoyado en todos los sentidos. En especial a mi madre, que lleva años esperando este momento, por fin tienes el único regalo que siempre me has pedido.

A todos, muchas gracias.

Abreviaturas

5'- Aza:	5-aza-2'-desoxicitidina	HMT:	Histona metiltransferasa
5caC:	5-carboxicitosina	HP1:	Proteína de la heterocromatina 1
5fC:	5-formilcitosina	IGFBP3:	Factor de crecimiento similar a insulina 3
5hmC:	5-hidroximetilcitosina	IL-6:	Interleuquina-6
5mC:	5-metilcitosina	IP:	Inmunoprecipitación
AML:	Leucemia Mieloide Aguda	JNK:	<i>Quinasa del dominio C-terminal de c-Jun</i>
AR:	Receptor de andrógenos	Kit:	Proto-oncogen receptor tirosina quinasa KIT
CDK	Quinasa dependiente de ciclina	LINE-1:	Long Interspersed Nuclear Element type 1
CDKN1A:	Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1A	MAPK:	Proteína quinasa activada por mitógenos
ChIP:	Inmunoprecipitación de cromatina	MBD:	Proteína de Unión a DNA Metilado
CRPC:	Cáncer de próstata resistente a la castración	MET:	Proto-oncogen receptor tirosina quinasa MET
DDR2:	Receptor tirosina quinada 2 con dominio de discoidina	miRNA:	microRNA
DHT:	Dihidrotestosterona	MTT:	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazo
DMSO	Dimetilsulfóxido	NEFL:	Neurofilamento ligero
DNMT:	DNA metiltransferasa	NF-κB:	Factor nuclear κB
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico	NPY:	Neuropéptido Y
EGFR:	Receptor de EGF	PBS:	Tampón fosfato salino
EZH2:	Enhancer of Zeste homolog 2	PI3K:	Fosfatidilinositol trifosfato
FBS:	Suero fetal bovino	PSA:	Antígeno Prostático Específico
FMR1:	Síndrome del X frágil	PTCH2:	Patched Homolog 2
GAPDH:	Gliceraldehído -3-fosfato deshidrogenasa	PTGS2:	Prostaglandina endoperoxidasa sintasa
GNG7:	Proteína G con subunidad gamma	PTK:	Proteína tirosina quinasa
GSTP1:	Glutación S-transferasa pi 1	PTP:	Proteína tirosina fosfatasa
H3K27me3:	Lisina 27 de la histona H3 trimetilada	qRT-PCR:	PCR cuantitativa a tiempo real
H3K4me2:	Lisina 4 de la histona H3 dimetilada	RARα:	Receptor de ácido retinoico α
H3K4me3:	Lisina 4 de la histona H3 trimetilada	RARβ:	Receptor de ácido retinoico β
H3S10:	Fosforilación de la Serina 10 de la histona H3	Rb:	Retinoblastoma
H4K16ac:	Lisina 16 de la histona H4 acetilada	RunX1T1:	Factor de transcripción translocado relacionado con Runt 1
HAT:	Histona acetiltransferasa	SAH:	S-adenosilhomocisteína
HDAC:	Histona desacetilasa	SAHA:	<i>suberoylanilide hydroxamic acid</i>
HDACi:	Inhibidor de las HDACs	SAM:	S-adenosilmetionina
HDM:	Histona demetilasa	SC:	<i>Scrambled</i> ; secuencia de siRNA desordenada
Hin-1:	Secretoglobulina familia 3A		

Abreviaturas

SEOM:	Sociedad Española de Oncología Médica	TET:	<i>Ten-eleven translocation</i>
Ser:	Serina	TGFβ:	Factor de crecimiento tumoral β
SH:	Dominio de homología Src	Thr:	Treonina
siRNA	RNA pequeño de interferencia	TNFSF8:	Factor de necrosis tumoral 8
TBX1:	Factor transcripcional T-Box	Tyr:	Tirosina
TDG:	Timidina Glicosilasa de DNA		

Abreviaturas

Resumen

El cáncer de próstata, el segundo tipo de cáncer más común en varones se desarrolla por un gran número de alteraciones genéticas y epigenéticas, que conducen a una desregulación de las vías de transducción de señales que controlan el comportamiento normal de las células de nuestro organismo. Por lo que conocer la interrelación entre las alteraciones epigenéticas y reguladores de la señalización celular en cáncer de próstata ayudará a encontrar nuevos biomarcadores, y a desarrollar terapias efectivas para el tratamiento personalizado de esta patología, uno de los mayores retos de la ciencia en nuestros días.

SHP-1 es una tirosina fosfatasa que regula la actividad de vías de transducción de señales implicadas en el crecimiento, diferenciación, migración, adhesión e invasión celular. Esta fosfatasa está presente en próstata humana normal y tumoral, pero se pierde su expresión en los tumores de próstata más agresivos e indiferenciados. Esto unido a la presencia de SHP-1 en el núcleo y su papel en el control del ciclo celular mediante cambios en la expresión de reguladores de este nos hizo plantearnos el posible papel de SHP-1 en la regulación de la expresión mediante el control de las modificaciones epigenéticas.

En este trabajo hemos encontrado que la anulación de la expresión de SHP-1, en células de cáncer de próstata, modifica la expresión de un grupo de genes inducido, al menos en parte, por cambios en la metilación de su región promotora. En concreto, se observa una correlación entre la pérdida de metilación del DNA de *RunX1T1*, *Gstp1* y *Kit* con un aumento de su expresión; y un aumento de los niveles de metilación de *CEBPD* que coincide con una disminución de su expresión. Por otro lado, se estudiaron los mecanismos por los que SHP-1 podría regular la expresión, y más concretamente las posibles interacciones de esta fosfotirosina fosfatasa con proteínas responsables de las modificaciones epigenéticas. En este sentido, se identificó la interacción entre SHP-1 y JAK2, una quinasa que fosforila a la tirosina 41 de la histona H3 (H3Y41), una marca relacionada con promotores transcripcionalmente activos. También hemos demostrado por primera vez, que SHP-1 interacciona con HDAC2, y que esto influye en su actividad represora, ya que cuando se anula la expresión de SHP-1 se produce un aumento de los niveles de acetilación globales, aumentó la acetilación en los promotores de los genes cuya expresión estaba aumentada (*Gstp1* y *Kit*). Por último, este trabajo demuestra que la anulación

de SHP-1 en las células LNCaP promueve la progresión tumoral favoreciendo que las células se comporten de manera similar a las resistentes al tratamiento hormonal. Del mismo modo, también hemos demostrado que la ausencia de SHP-1 incrementa su capacidad migratoria e invasora en células de cáncer de próstata sensibles a andrógenos (LNCaP).

En conclusión, en este trabajo hemos demostrado que SHP-1 está implicada en la regulación de la expresión génica mediante la metilación del DNA y la regulación de la acetilación de histonas. Además de demostrar que SHP-1 está implicada en la progresión tumoral.

Introducción	1
1. Próstata.....	1
2. Cáncer de próstata.....	1
3. Fosfotirosinas fosfatasas (PTPs).....	4
3.1. Clasificación.....	4
3.2. PTPs con dominios SH2	6
4. Epigenética	13
4.1. Modificaciones epigenéticas	13
4.2. Relación entre los responsables de las modificaciones epigenéticas.....	28
4.3 Epigenética y cáncer de próstata.....	29
Objetivos.....	37
Materiales y Métodos.....	38
1. Cultivo celular.....	38
2. Transfección de RNA de interferencia	39
3. Transfección estable de SHP-1 con partículas lentivirales	39
4. Inmunofluorescencia	40
5. Extracción de DNA de líneas celulares.....	40
6. Análisis de la metilación del DNA.....	41
6.1. Modificación del DNA con bisulfito sódico	41
6.2 Plataformas de análisis epigenómico	41
6.3 Secuenciación genómica del DNA modificado	43
.....	45
7. Análisis de expresión génica	46
7.1. Extracción de RNA.....	46
7.2. Síntesis de cDNA.....	46
7.3. Cuantificación de la expresión génica por PCR a tiempo real	47
8. Análisis de enriquecimiento de marcas específicas de histonas.....	48
8.1. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	48
9. Análisis de la expresión proteica.	49
9.1. Obtención de extractos proteicos.....	49
9.2. Fraccionamiento subcelular	50
9.3 Extracción ácida de histonas	50
9.4. Inmunodetección de proteínas (<i>Western Blot</i>)	51
10. Análisis de interacciones entre proteínas	52
10.1 Ensayos de <i>Pull Down</i> . (Captura y unión).....	52

10.2. Inmunoprecipitación	54
11. Ensayos funcionales <i>in vitro</i>	55
11.1. Ensayos de proliferación celular	55
11.1.1. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	55
11.2. Ensayo de adhesión celular	56
11.3. Ensayo de migración	56
11.4 Ensayo de invasión celular	57
12. Análisis bioestadístico	58
Resultados.....	60
1. Efecto de la anulación de SHP-1 sobre la metilación de los promotores en líneas de cáncer de próstata.....	62
2. Efecto de la anulación SHP-1 sobre la expresión génica desde un punto de vista epigenético.....	66
4. Efecto de la anulación estable de SHP-1 sobre la expresión génica en cáncer de próstata.	74
5. Interacción de SHP-1 con JAK2 en células de carcinoma prostático.	79
6. Interacciones de SHP-1 con proteínas epigenéticas	84
7. Efecto de la anulación de SHP-1 sobre la acetilación de la histona H3	88
8. Caracterización del fenotipo de las líneas de cáncer de próstata con anulación estable de SHP-1	90
8.1 Modificación de la proliferación celular en ausencia de SHP-1	91
8.2 Cambios en el fenotipo migratorio e invasivo en ausencia de SHP-1.....	95
Discusión	99
1. SHP-1 regula la expresión génica mediante cambios en la metilación del DNA	100
2. SHP-1 regula la expresión interaccionando directa o indirectamente con proteínas epigenéticas.....	105
3. SHP-1 regula la progresión tumoral en células de cáncer de próstata.....	108
Conclusiones	111
Bibliografía.....	112

Introducción

1. Próstata

La próstata es una glándula del tamaño de una nuez presente en hombres y situada en la pelvis, delante del recto por debajo de la vejiga que se encuentra envolviendo parte de la uretra. Es un órgano de naturaleza fibromuscular y glandular que presenta una morfología de pirámide invertida. Histológicamente la próstata está distribuida en tres zonas bien definidas que conforman tres lóbulos (lóbulos o zonas), dos laterales y uno central¹ (figura 1.1) Además, pueden diferenciarse tres tipos de células: células epiteliales secretoras, que son células bien diferenciadas entre sí y que participan en la expulsión del líquido eyaculado bajo estimulación nerviosa; células basales, que están poco diferenciadas y de aspecto similar a fibroblastos² y células neuroendocrinas que se encuentran distribuidas irregularmente a lo largo de todo el epitelio y que expresan PSA y fosfatasa ácida prostática³.

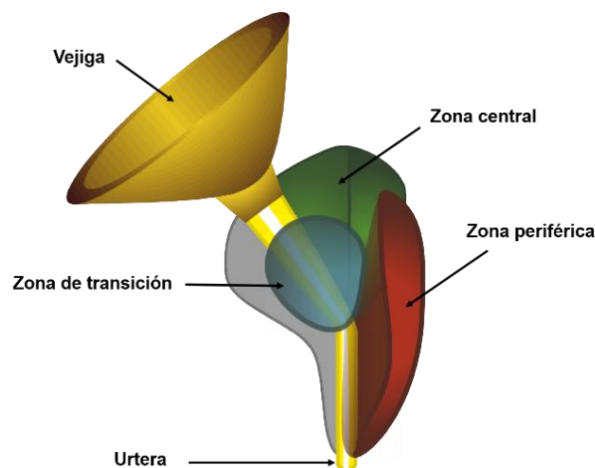


Figura 1.1. Esquema de la glándula prostática. Adaptado de LaTayia Aaron⁴,

2. Cáncer de próstata

El cáncer de próstata es el cuarto tipo de cáncer más común incluyendo ambos sexos, y el segundo más común en hombres, en los que supone la quinta causa de mortalidad por cáncer a nivel mundial. Se estima que en el año 2018 esta enfermedad fue la responsable de la muerte de 358.989 varones a nivel mundial. A pesar de su elevada incidencia en las regiones más desarrolladas, donde se diagnostican alrededor del 70% de los casos, la mortalidad por causa de esta patología es mayor en regiones menos desarrolladas⁵ (figura 1.2).

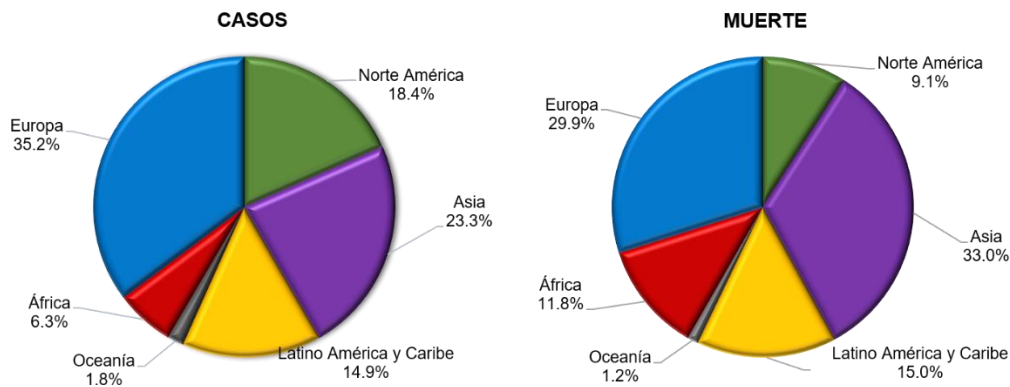


Figura 1.2. Incidencia y mortalidad del cáncer de próstata a nivel mundial. Los datos representados están basados en las estadísticas del cáncer de GLOBOCAN 2018.

La incidencia del cáncer de próstata en España y Europa en los últimos años ha aumentado convirtiéndose en el cáncer más diagnosticado entre los varones, con 35.126 nuevos casos en 2018 de acuerdo con la SEOM (Sociedad Española de Oncología Médica). Este aumento de la incidencia se debe, principalmente, al uso del test del antígeno prostático específico (PSA). Así, se estima que en España la tasa de incidencia ajustada a la población estándar europea pasó de 54,1 por 100.000 en el periodo 1993-1997 a 96,4 en 2003-2007. En este último periodo, la tasa de incidencia ajustadas a la población mundial estándar varió entre 44,1 por 100.000 en Granada y 73,8 por 100.000 en el País Vasco⁶, siendo estas diferencias un reflejo del grado de utilización de dicho *test*. El uso de este *test* ha favorecido, además, el diagnóstico precoz del cáncer de próstata aumentando la supervivencia, al poderse tratar la patología en estadios más tempranos y con mejor pronóstico. En España el carcinoma prostático es la tercera causa de muerte por cáncer en varones, tras el cáncer de pulmón y el colorrectal. Se estima que en 2018 en España fallecieron 5.841 varones por esta patología.

El cáncer de próstata es una patología relacionada con la edad ya que un 85% de los casos son diagnosticados después de los 65 años⁷. Hay otros factores que aumentan el riesgo de padecer esta enfermedad tales como la dieta, la etnia, antecedentes familiares y factores ambientales^{8,9}. Por todo esto, el cáncer de próstata se ha convertido en un serio problema sanitario a nivel nacional e internacional.

La mayoría de los tumores prostáticos se desarrollan en las células epiteliales de la glándula prostática y se denominan adenocarcinomas prostáticos. En cuanto a las alteraciones moleculares implicadas en el desarrollo y progresión de esta patología podemos destacar la activación de proto-oncogenes, la inactivación de enzimas

reparadoras del DNA, la inactivación de genes supresores de tumores y un incremento en la síntesis y actividad de factores de crecimiento y sus receptores¹⁰. Un gran número de estas alteraciones están provocadas por cambios en las modificaciones epigenéticas como la metilación anormal del DNA y las modificaciones post-traduccionales de las histonas que describiremos más adelante.

Existen diferentes terapias adecuadas para el tratamiento del cáncer de próstata dependiendo de la etapa en la que se encuentre el paciente, aunque se suelen combinar para conseguir una mayor eficacia terapéutica. Estas son I) Vigilancia activa, II) Cirugía, III) Radioterapia y quimioterapia, IV) Crioterapia (Criocirugía) y V) Terapia hormonal.

La ablación androgénica es la más utilizada en la fase avanzada de esta patología, ya que los andrógenos son necesarios para el desarrollo y funcionamiento normal de la próstata, además de jugar un papel clave en la progresión de la patología¹¹. Con esta terapia se reducen los niveles de andrógenos circulantes mediante la castración quirúrgica o química con agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), antagonistas o una terapia combinada de ambas. Sin embargo, un porcentaje de los tumores de próstata no responde al tratamiento hormonal y acaban progresando a estadios más avanzados y agresivos de la enfermedad, por lo que es necesaria la búsqueda de terapias alternativas¹².

La principal causa de muerte por cáncer de próstata se debe a la naturaleza metastásica que adquiere el tumor tras dejar de responder al bloqueo androgénico continuado, debido a la progresión a una fase independiente de andrógenos. Entre un 10% - 20% de los pacientes de cáncer de próstata desarrollarán enfermedad resistente a la castración (CRPC)¹³.

Los mecanismos responsables por los que se desarrolla resistencia al bloqueo hormonal no están del todo claros. Un bajo porcentaje de estos tumores pierde la expresión del AR, pero en la mayoría está resistencia cursa manteniéndola, aunque la activación del receptor no tiene porqué ser por vías dependientes de ligando. Entre los mecanismos que se producen contamos con: 1) el mantenimiento de los niveles de testosterona y DHT residuales en el microambiente del tumor. En CRPC se ha observado un aumento intracelular de la expresión de genes que convierten andrógenos adrenales a testosterona¹⁴. 2) Un aumento de los niveles y la actividad de AR mediante amplificación, mutación o isoformas obtenidas por *splicing* alternativo¹⁵. 3) Modificación de la expresión y/o actividad de los co-reguladores reclutados por

AR¹⁶. 4) Diferenciación neuroendocrina de las células tumorales, lo que implica una pérdida o disminución de la expresión del AR, así como de marcadores tumorales y liberación de neuropéptidos que pueden estimular la proliferación celular localmente¹⁷. 5) Activación de vías de señalización alternativas, reguladas por receptores tirosina quinasa, citoquinas y quinasa no receptores como EGFR, receptor de IL-6, Src y PI3K/Akt que actuando a través de AR o de forma independiente estimulan la proliferación celular¹⁸. Todos estos mecanismos no son excluyentes, es decir, que varios de ellos pueden ser los responsables del desarrollo de tumores independientes de andrógenos.

3. Fosfotirosinas fosfatasas (PTPs)

Los procesos de fosforilación son esenciales en la regulación de numerosas vías de señalización claves en la homeostasis celular, al ser procesos rápidos y fácilmente reversibles. Concretamente, la fosforilación en residuos de tirosina modula la actividad de proteínas que regulan procesos como la proliferación, diferenciación, regulación de la expresión génica y procesamiento de RNAm entre otros¹⁹. Las proteínas encargadas de mantener este equilibrio en residuos de tirosina son, por un lado, las quinasa de tirosina (PTK) que añaden grupos fosfato, y por otro lado las fosfotirosinas fosfatasas (PTP) que se encargan de defosforilar. En este trabajo nos centraremos en el papel de las fosfatasas.

Los sustratos a los que pueden defosforilar las PTPs van a depender de dos factores principalmente: la especificidad intrínseca de la PTP por dicho sustrato y la localización celular²⁰.

3.1. Clasificación

Hoy en día, se conocen más de 100 PTPs, aunque algunas de ellas actúan contra sustratos distintos de tirosina fosforiladas, como pueden ser fosfoSer/fosfoThr o fosfoinositidos. Todas ellas comparten entre si un mismo mecanismo catalítico pero se diferencian en el residuo que inicia el ataque nucleofílico lo que permite distinguir tres grandes familias^{19,21} (tabla 1):

- PTPs basadas en cisteína
- PTPs basadas en aspártico
- PTPs basadas en histidina (HPs)

Las PTPs basadas en cisteínas presentan un dominio de seis aminoácidos en el centro catalítico con una cisteína como residuo principal y se dividen en tres clases: las de clase I, que engloba proteínas específicas de residuos de tirosina y otras con especificidad dual; las de clase II son de bajo peso molecular; y las de clase III son de la familia de proteínas CDC25.

Tabla 1.1. Familia de las tirosinas fosfatasas en el genoma humano. Cada color indica una familia de tirosinas fosfatasas. Los números indican los miembros que forman cada grupo y se indican los sustratos sobre los que actúan. (Tabla modificada de Alonso y Pulido, 2016²¹).

					Sustrato	
Basadas en cisteína CxxxxxR	Clase I	Subclase I	Clásica	37	p-Tyr, PIPs	
		Subclase II	VH1-Like	64	p-Tyr, p-Ser, p-Thr, PIPs, otros	
		Subclase III	SACs	5	PIPs	
		Subclase IV	PALD1	1	Desconocido	
		Subclase V	INPP4s	2	PIPs	
		Subclase VI	TMEM55s	2	PIPs	
	Clase II			LMW-PTP	1	p-Tyr
				SSU72	1	p-Ser
	Clase III		CDC25s		3	p-Tyr, p-Thr
	Basadas en aspártico	HAD		EYAs	4	p-Tyr, p-Ser
Basadas en histidina	PGM		UBASH3s	2	p-Tyr	
	Fosfatasas ácidas		ACPs	3	p-Tyr, pSer, p-Thr, otro	

La clase I son el grupo más numeroso y se subdivide a su vez en seis subclases, siendo las mejor conocidas las denominadas PTPs clásicas, que son específicas de fosfoTyr. Este grupo se divide a su vez en PTPs similares a receptor, localizadas en

estructuras de membrana y que presentan una región extracelular, un dominio de membrana y una región intracelular con uno o dos dominios catalíticos muy conservados donde reside la actividad fosfatasa; y las PTPs no receptor tienen una organización modular, además del dominio catalítico muy conservado poseen otros dominios que juegan un papel importante en la localización celular y regulación de su actividad enzimática²² (figura 1.3).

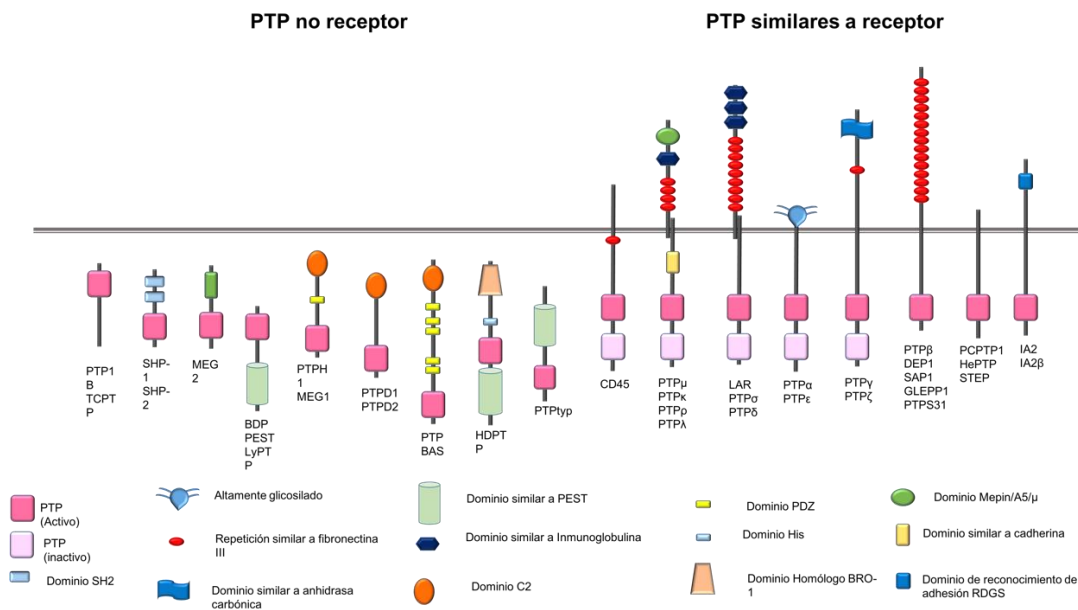


Figura 1.3. Representación de los miembros de las PTPs clásicas. Se muestran algunos de los representantes de PTPs con implicaciones demostradas en el cáncer. Imagen modificada de Andersen *et al.*²³

La regulación de la actividad de las PTPs se realiza de diversas formas, en PTPs similares a receptores mediante unión a ligando o dimerización²⁴. En el caso de las PTPs no receptor por autorregulación o localización celular y para ambos casos existe una regulación por fosforilación y por oxidación^{22,25}.

3.2. PTPs con dominios SH2

La acción de las PTPs está supeditada a la localización celular de la misma y a su especificidad por el sustrato. Las PTPs clásicas no similares a receptores además del centro catalítico, poseen diversos dominios adicionales, como los dominios Src homology 2 (SH2), que permiten la interacción de estas fosfatasas con proteínas que presenten residuos de tirosina fosforilados. Estos dominios son frecuentes en PTK, pero solamente dos PTPs humanas los poseen, estas son SHP-1 y SHP-2¹⁹. Estas PTPs son muy parecidas estructuralmente entre ellas, pero la función celular que realizan es muy diferente, debido a los diferentes residuos de aminoácidos que forman

el dominio SH2. Mientras que SHP-1 es considerada un regulador negativo de vías de señalización, SHP-2 se encarga de promover proliferación, diferenciación y crecimiento celular, aunque no se las puede considerar a ninguna de las dos solamente como reguladores positivos o negativos dado que la función de estas proteínas varía dependiendo del tejido donde se exprese²⁶.

3.2.1. SHP-1

SHP-1 es una fosfotirosina fosfatasa codificada por el gen *ptpn6*. Se expresa principalmente en células del sistema hematopoyético, aunque también se ha descrito su presencia en células epiteliales de ovario²⁷, mama²⁸, páncreas²⁹ y próstata³⁰ entre otros. La importancia de esta fosfatasa se demostró gracias a los experimentos realizados con dos grupos de ratones: los ratones *motheaten* (*me*), que desarrollaron una mutación espontánea que provocaba la pérdida de expresión de esta proteína y los *motheaten viables* (*me^v*) que presentaban una proteína deficiente con una actividad del 25%³¹. Estos ratones presentaban deficiencias en el sistema inmune que acortaban su vida, de manera más notable en los ratones homocigotos *me/me*, lo que señaló la importancia de SHP-1 en el sistema inmune y hematopoyético³².

El gen que codifica para SHP-1 se localiza en el cromosoma 12p13³³, consta de 17 exones y codifica para diversas formas de SHP-1 ya que presenta dos promotores, el P1 que dirige la transcripción desde el exón 1 y el P2 que inicia la transcripción en el exón 2. Inicialmente se pensó que el promotor 1, situado 7Kb *upstream* del promotor 2, era activo en células no hematopoyéticas, mientras que el promotor 2 lo era exclusivamente en células hematopoyéticas³⁴, pero en 2013 el grupo de Evren³⁵ encontró transcritos de SHP-1 en células epiteliales con ambos exones. En la actualidad se conocen 6 isoformas de SHP-1, 3 de ellas provienen del promotor 1 y dos del promotor 2. La sexta isoforma proviene de un *splicing* alternativo en el exón 16, que da lugar a una proteína más larga, SHP-1L, que contiene un dominio rico en prolina en el extremo C-terminal que le permite interactuar con proteínas que posean dominios SH3³⁶.

SHP-1 está compuesta por dos dominios SH2 en tándem en el extremo N-terminal seguidos de un dominio catalítico (dominio PTP) y una cola C-terminal (figura 1.4), donde se localiza una señal de localización nuclear (NLS) encargada de su translocación al núcleo³⁷ y distintas serinas y tirosinas, cuya fosforilación puede resultar de vital importancia para la regulación de su función³⁸.



Figura 1.4. Estructura de la proteína SHP-1. Dominio N-SH2 está representado en naranja, el C-SH2 en azul, el dominio PTP en rosa y las uniones entre ellos están en marrón.

Los dominios SH2, localizados en el extremo N-terminal, son claves en la regulación de esta fosfatasa al estar implicados en la autoinhibición de la proteína³⁹. Estudios con la proteína truncada en N-SH2, demostraron que la falta de este dominio aumentaba la actividad fosfatasa de la proteína truncada^{35,39}. Del mismo modo, estudios *in vitro* han demostrado que la unión de fosfopéptidos a los dominios SH2 también aumenta su actividad³⁸. En 2003 Yang *et al.*⁴⁰, cristalizaron una forma truncada de SHP-1 en el extremo C-terminal y observaron que el dominio N-SH2 bloqueaba el centro catalítico del dominio PTP manteniendo la enzima en una conformación inactiva y que el dominio C-SH2 quedaba disponible para interactuar con activadores de fosfotirosina debido a su flexibilidad y tener una orientación diferente. Años después, Wang *et al.*⁴¹ cristalizaron la proteína completa observando que, N-SH2 actúa como un interruptor bloqueando el centro activo. La unión de un ligando a los dominios SH2 produce un cambio conformacional en la proteína liberando N-SH2 y girando C-SH2, lo que desplaza N-SH2, favoreciéndose así la liberación del centro activo. Esta conformación abierta se estabiliza por interacciones entre los dominios SH2 e interacciones entre N-SH2 y el dominio PTP (figura 1.5).

La regulación de la actividad de esta fosfatasa va a depender también, como ya hemos mencionado, de las fosforilaciones que sufren los residuos del extremo C-terminal, aunque los resultados publicados distan de ser concluyentes. Algunos trabajos afirman que la fosforilación de los residuos Tyr536 y Tyr564 permiten a SHP-1 actuar como proteína adaptadora reclutando proteínas a complejos de señalización⁴² o le permiten reclutar sustratos para su actividad fosfatasa⁴³. Incluso, otros estudios sugieren que la fosforilación de estas tirosinas por el receptor de insulina, induce la activación de SHP-1⁴⁴, al igual que sucede cuando son fosforiladas por Src⁴⁵. Por el contrario, la fosforilación de la Ser591 produce un efecto inhibitorio de la actividad fosfatasa de la proteína^{46,47}, además de regular su localización, disminuyendo su presencia en la membrana e inhibiendo su translocación nuclear⁴⁸. Por otro lado, se ha demostrado que la unión de lípidos, como ácido fosfatídico, fosfatidilserina o PIP3,

al extremo C-terminal regula la actividad de SHP-1 al incrementar su actividad fosfatasa, además de afectar en su localización celular⁴⁹.

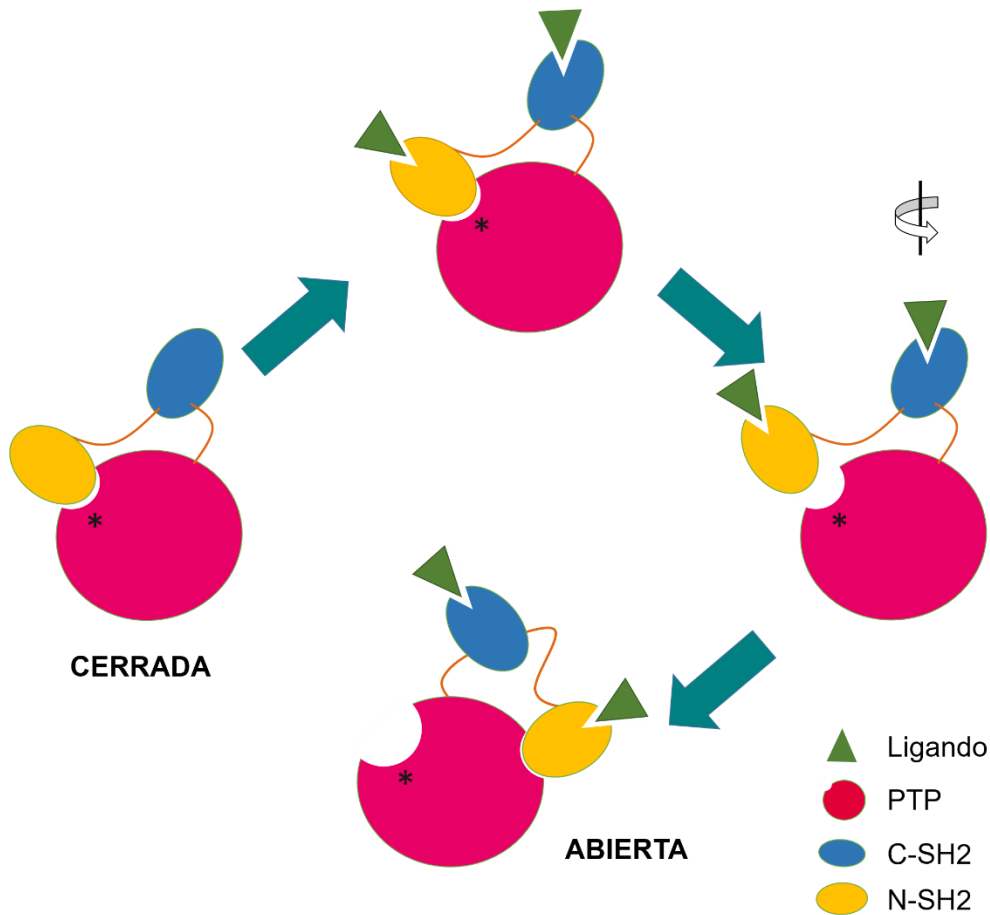


Figura 1.5. Esquema del mecanismo de activación propuesto por Wang *et al.*⁴¹. El asterisco indica el sitio activo de la enzima. El ligando está representado en verde. El dominio N-SH2 bloquea el sitio activo del dominio PTP en la conformación cerrada. La unión del ligando a los dominios SH2 provocará cambios conformacionales, lo que producirá la liberación del dominio N-SH2 del dominio PTP. Esto desencadenará la rotación del dominio C-SH2, el reposicionamiento del dominio N-SH2 y la consiguiente exposición del sitio activo del dominio catalítico⁴¹.

Como ya hemos mencionado, SHP-1 es una fosfatasa que se expresa fundamentalmente en células hematopoyéticas, aunque también está presente en células epiteliales localizándose tanto en el citosol como en el núcleo^{37,50}.

SHP-1 tiene una gran relevancia en el desarrollo y en la activación de células hematopoyéticas; los estudios realizados en los ratones *motheaten*, han demostrado que SHP-1 es un regulador negativo de vías de transducción de señales y su ausencia produce defectos en el sistema inmunológico³². Por esto, el estudio de SHP-1 ha pasado a ser de gran interés en el ámbito de las enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide, asma, esclerosis múltiple, dermatitis y alergias. De esta manera se

sabe que SHP-1, además de ser necesario para el desarrollo de las células hematopoyéticas, interacciona con inmunorreceptores, factores de transcripción y moléculas adaptadoras que son necesarias para la regulación de las vías de señalización en el sistema inmune²⁶.

Por otro lado, en las células epiteliales, SHP-1 está implicada en la regulación de vías de transducción de señales relacionadas con proliferación celular, diferenciación, supervivencia, migración, adhesión y apoptosis (figura 1.6). A pesar de haberse descrito diferentes papeles, como ser un regulador negativo en la reabsorción ósea⁵¹ o ser clave en la morfogénesis del sistema genitourinario⁵², su función aún no está del todo clara⁵³.

Para ejercer estas funciones, SHP-1 interactúa con receptores transmembrana implicados en la respuesta inmune (BCR, TCR), apagando así las señales activas o activando otras vías como la apoptosis; con receptores de citoquinas (EPO-R⁴²) y receptores de factores de crecimiento con actividad tirosina quinasa (CSF-1⁵⁴) inhibiendo su actividad y las vías de señalización que regulan^{55,56}. También se une a otras proteínas tirosina quinasa citosólicas, en este sentido, nuestro grupo de investigación ha demostrado que SHP-1 regula negativamente la vía de PI3K/AKT al interactuar con la subunidad p85 de PI3K⁵⁷. Otros estudios han revelado que SHP-1 se encarga de translocar al núcleo a PDK1, una de las proteínas que fosforila AKT⁵⁸. Diversos estudios demuestran que SHP-1 actúa como un modulador negativo de la vía de JNK, como sucede en células epiteliales de los bronquios donde SHP-1 inhibe a c-Jun impidiendo que se active la expresión de enzimas detoxificadoras⁵⁹. Por otro lado, se ha descrito que en células musculares lisas SHP-1, inducida por el receptor de angiotensina II (AT2), inhibe c-Jun a través de PyK2 provocando la inhibición del crecimiento⁶⁰. Del mismo modo, en células endoteliales la activación de SHP-1 por parte de TNF- α inhibe la proliferación celular inducida por factores de crecimiento⁶¹. Al igual que se ha observado que en células cancerígenas prostáticas SHP-1 media el efecto antiproliferativo de la somatostatina³⁰. Sin embargo, en mastocitos de la médula ósea, SHP-1 está inhibiendo la actividad de ERK favoreciendo, de esta manera, la proliferación y la apoptosis mediada por IL-3⁶².

En células epiteliales del intestino se ha observado que el aumento de la expresión de SHP-1 y de su actividad fosfatasa produce parada en el ciclo celular y diferenciación de las células⁶³. Esta fosfatasa también es clave en la regulación de la función de la catenina y la adhesión célula-célula mediada por cadherina, como se ha visto en células A431 y en páncreas^{64,65}.

Con todo esto podemos decir que SHP-1 posee un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis celular debido a la gran cantidad de procesos en los que está implicada.

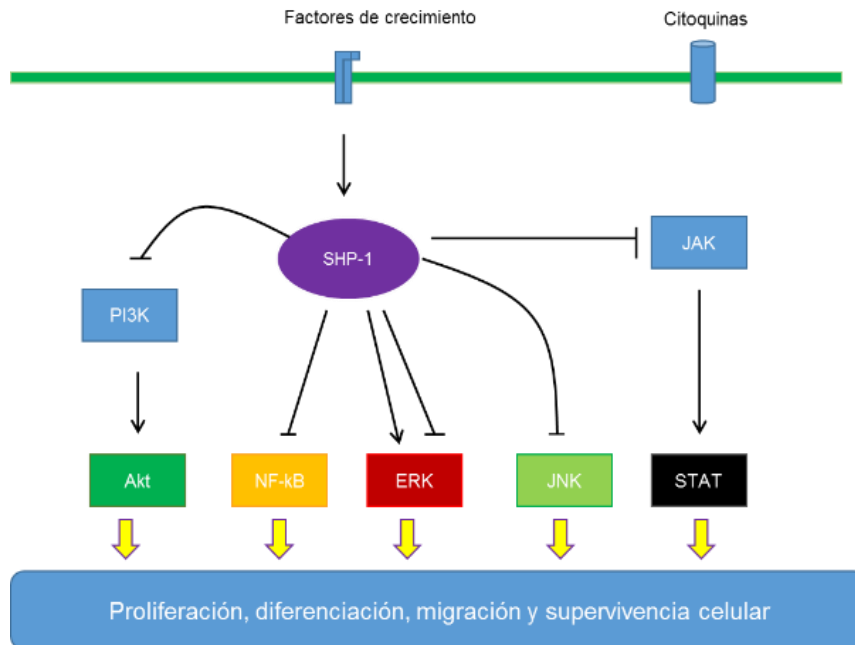


Figura 1.6. Vías de señalización reguladas por SHP-1. SHP-1 es clave en la regulación de vías activadas por factores de crecimiento y citoquinas, que modulan procesos biológicos esenciales. SHP-1 es capaz de reprimir la actividad de la ruta PI3K/AKT en algunos tipos celulares, así como del factor NF-κB. También regula a las quinasas ERK dependiendo del contexto celular. Además de inhibir la activación de las JNKs y la ruta de las JAK/STAT⁶⁶.

3.2.1.1. SHP-1 y cáncer

El papel de SHP-1 en cáncer es bastante controvertido ya que va a depender del tejido de estudio. Históricamente SHP-1 se ha considerado un gen supresor de tumores, debido a que funciona como antagonista de tirosinas quinasas potencialmente oncogénicas implicadas en la progresión tumoral. De hecho, se han observado bajos niveles de expresión de SHP-1 en leucemias y linfomas además de en cáncer colorrectal, cáncer de próstata y en líneas de cáncer de mama que no expresan el receptor de estrógenos^{30,67}. Por el contrario, se ha detectado su sobreexpresión en cáncer de mama y ovario, llegando incluso a considerarse los niveles elevados de esta proteína como un marcador de cáncer ovárico⁶⁸.

Como ya hemos comentado anteriormente, SHP-1 es considerado principalmente un regulador negativo de vías de señalización celular que controlan procesos de proliferación, migración, adhesión y angiogénesis, procesos

directamente ligados con la progresión del cáncer, por lo que variaciones en los niveles de esta proteína pueden provocar una desregulación de los mismos⁵³. En este sentido, estudios recientes han demostrado la importancia de SHP-1 en la proliferación celular en diferentes tipos de cáncer. En carcinoma de células renales se ha demostrado que la inhibición tanto de la expresión como de la actividad de esta fosfatasa por la acción de PDZK1 provoca una disminución de la proliferación y de la migración⁶⁹, lo que concuerda con resultados de nuestro grupo que demuestran que la inhibición de SHP-1 en las células de cáncer de próstata PC3 provocan una parada del ciclo celular⁵⁷. Por el contrario, en células epiteliales de intestino se ha observado que la pérdida de expresión de esta fosfatasa en ratones provoca un aumento de la proliferación por lo que se considera que esta proteína posee una función protectora⁷⁰. En este sentido, Tassidis *et al.* describieron un aumento de la proliferación en células LNCaP al inhibir SHP-1, debido a mayores niveles de ciclina D1 que permiten a las células alcanzar la fase S del ciclo celular más fácilmente⁷¹. SHP-1 también posee un papel en la transición epitelio-mesénquima (EMT), concretamente estudios en células de carcinoma hepático indican que esta fosfatasa inhibe la EMT al inactivar a STAT3, neutralizando el efecto inductor de TFG- β ⁷². Estudios posteriores en cáncer colorrectal confirmaron la implicación de SHP-1 en la inhibición de la EMT, además de relacionar los niveles de SHP-1 con los de E-cadherina y con la supervivencia de pacientes que presentan esta patología. Observaron que cuanto mayores eran los niveles de SHP-1, mayores eran los de E-cadherina y mayor la supervivencia de los pacientes⁷³.

Por otro lado, en tumores de mama HER2-positivo, resistentes al tratamiento con Trastuzumab, el aumento de expresión de SHP-1 induce la defosforilación de EGFR y HER2, provocando una mayor sensibilidad de estas células al tratamiento con trastuzumab⁷⁴.

Todos estos datos indican la implicación de esta fosfatasa en distintos procesos tumorales, por lo que es necesario ampliar nuestro conocimiento acerca de SHP-1 y su papel en el desarrollo del cáncer en general y en el de próstata en particular, lo que podría ser muy útil, además para su uso como posible biomarcador y diana terapéutica.

4. Epigenética

El término de epigenética fue acuñado por primera vez por C.H. Waddington, que la definió como “la rama de la biología que estudia las interacciones causales entre los genes y sus productos que dan lugar al fenotipo”^{75,76}. Con el paso del tiempo, esta definición ha ido evolucionando hasta llegar a la actual, que define la epigenética como el estudio de los cambios en la función génica que son mitótica y/o meióticamente heredables y que no implican cambios en la secuencia de DNA^{77,78}. Los mecanismos epigenéticos van a permitir que células con el mismo contenido genético presenten fenotipos diferentes, lo que nos permite explicar cómo células con la misma información génica se diferencian durante el desarrollo manteniendo esta diferenciación durante las sucesivas divisiones celulares⁷⁹. De esta manera, el estudio de la epigenética nos ayuda a entender como los gemelos monocigóticos, individuos con un genoma idéntico, presentan diferencias fenotípicas y distinta predisposición a padecer enfermedades⁸⁰.

4.1. Modificaciones epigenéticas

Las modificaciones epigenéticas regulan la estructura y la función de la cromatina modulando su grado de compactación, así como la expresión de los genes. Entre estas modificaciones se incluyen la metilación del DNA, las modificaciones post-traduccionales de histonas, los complejos remodeladores de la cromatina y los RNAs no codificantes. De estas, las más conocidas y en las que nos vamos a centrar son la metilación del DNA y las modificaciones post-traduccionales de las histonas⁸¹.

4.1.1. Metilación del DNA

La metilación del DNA es la modificación epigenética mejor estudiada hasta el momento, y juega un papel importante en la regulación de la expresión génica. Esta modificación consiste en la adición de un grupo metilo (-CH₃) en las citosinas que preceden a guaninas y que están formando los denominados dinucleótidos CpG.

La metilación del DNA es un proceso necesario y de gran valor en organismos procariotas y eucariotas. En bacterias ejerce una función protectora impidiendo que se introduzca DNA extracelular, sin embargo, en animales y plantas regula la expresión génica siendo clave en los procesos de desarrollo⁸². En mamíferos, además de controlar la expresión génica, regula otros procesos como el grado de compactación y la estabilidad del material genético⁸¹.

Los dinucleótidos CpG no están distribuidos por el genoma al azar, sino que están concentrados en regiones llamadas “islas CpG”. Estas islas CpG fueron definidas como regiones de DNA con un tamaño aproximado de 1Kb cuyo contenido de guanina y citosina (G+C) es mayor del 50%⁸³, y que se localizan en la región promotora de aproximadamente el 60% de los genes. La metilación de las islas CpG en la región promotora se asocia con una inhibición de la transcripción génica. En células normales, las regiones promotoras de los genes no suelen estar metiladas, salvo en algunas excepciones que están relacionadas con el desarrollo, como es el caso de genes imprintados, el cromosoma X en mujeres y en genes implicados en el desarrollo y diferenciación tisular⁸⁴.

La impronta génica es un fenómeno por el cual se silencia uno de los alelos de un gen en función de su origen parental, permitiendo por tanto, que solo se exprese uno de los dos⁸⁵. Algo similar ocurre con la inactivación del cromosoma X en mujeres para compensar la dosis respecto a los varones, la elección del cromosoma que se inactiva al azar y ocurre en estadios tempranos del desarrollo⁸⁶. El silenciamiento por metilación del DNA de genes específicos en momentos determinados del desarrollo permite que células con la misma dotación génica se diferencien en distintos tipos celulares, y que desarrollen funciones diferentes en el organismo⁸⁷. También se encuentran metilados los elementos repetitivos y las secuencias endoparasitarias como mecanismo de defensa para prevenir su translocación y cambios en la expresión de genes en los que se pueden insertar⁸⁸. Por tanto, la metilación del DNA es muy importante en el mantenimiento de la estabilidad genómica y en la organización de la cromatina.

Por otro lado, el cuerpo de los genes y las regiones intergénicas son zonas pobres en dinucleótidos CpG y estos suelen presentarse metilados. A diferencia de lo que sucede en promotores, esta metilación no supone una inhibición de la transcripción, sino que favorece su elongación⁸⁹, regula el *splicing*⁹⁰ y controla la actividad de los promotores alternativos que pueda poseer el gen⁹¹.

Por tanto, la metilación del DNA es determinante en el mantenimiento de la homeostasis celular. De hecho, los estudios realizados en las dos últimas décadas han demostrado la importancia de la desregulación de esta modificación epigenética en el desarrollo de diversas patologías, como el Síndrome de Rett, lupus, arteroesclerosis y cáncer entre otras⁹².

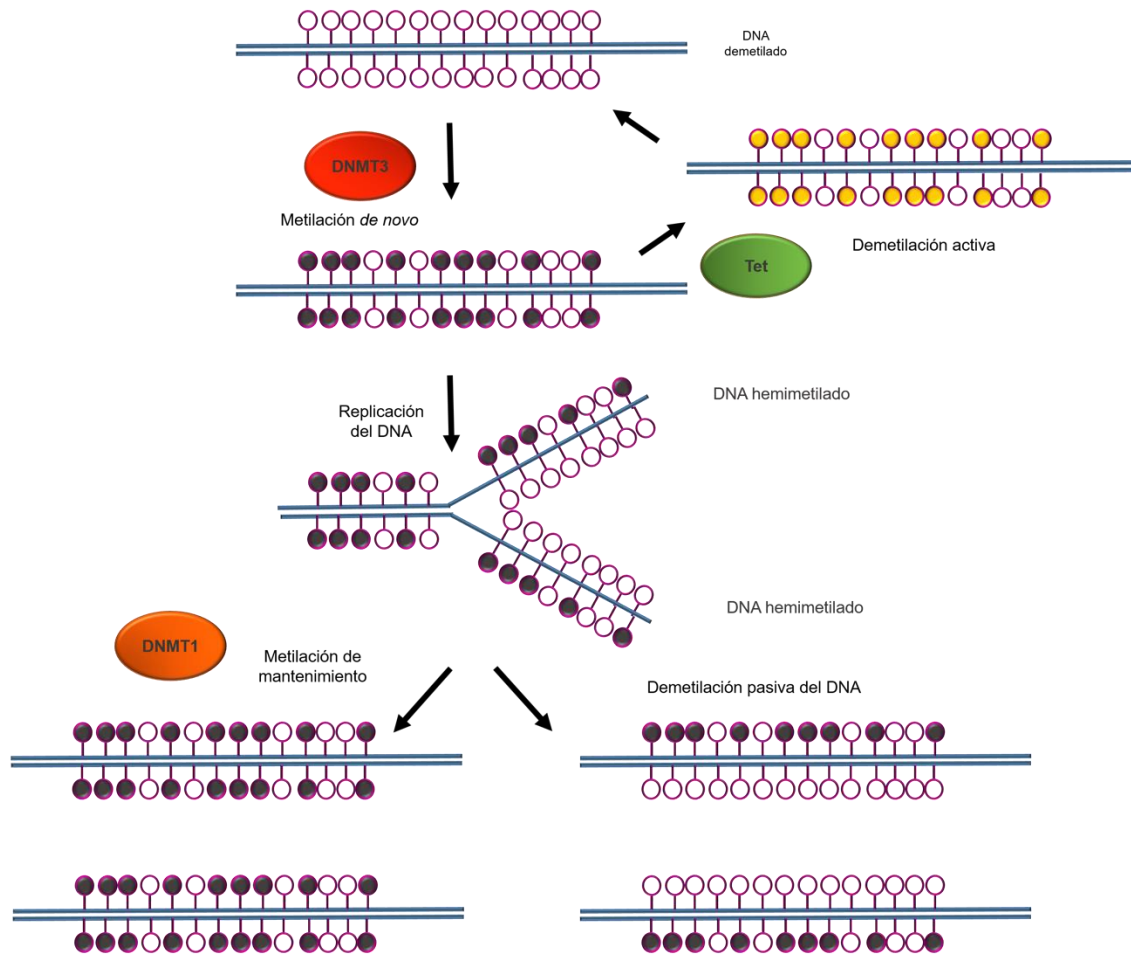


Figura 1.7. Esquema de la metilación *de novo* y de mantenimiento. Los dinucleótidos CpG representados con círculos, blancos (no metilados), amarillos (producto de la acción enzimática de las TET) y negros (metilados), pasan a estar metilados por la acción de las DNMTs *de novo*, en la replicación se mantienen la metilación por la DNMT1 y el proceso de demetilación lo llevan a cabo las TET. Figura modificada de Li and Zhang 2016⁹³.

La metilación del DNA está regulada por la acción contrapuesta de las DNA metiltransferasas (DNMTs) encargadas de metilar el DNA, y las TETs (*ten-eleven translocation*) que demetilan el DNA⁹⁴ (figura 1.7).

4.1.1.1. Metilación del DNA: DNA metiltransferasas

La metilación del DNA es un proceso dinámico catalizado por las DNMTs, que se encargan de añadir un grupo metilo en la posición 5' de citosinas que forman parte de dinucleótidos CpG, utilizando como donador el S-adenosilmetionina (SAM) (figura 1.8).

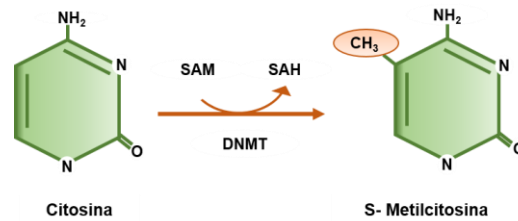


Figura 1.8. Reacción de metilación de DNA. Reacción producida en citosinas que forman parte de dinucleótidos CpG. SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilhomocisteína; DNMT: DNA metiltransferasa.

En organismos eucariotas, la familia de las DNMTs está formada por cinco miembros: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L. Todas ellas comparten un dominio C-terminal DNA- (citosina-5-) metiltransferasa formado por 10 motivos estructurales con una secuencia muy conservada y una porción N-terminal variable, excepto DNMT3L a la que le falta el dominio catalítico⁹⁵. En función de su actividad podemos dividir las en DNMTs de mantenimiento (DNMT1) y *de novo* (DNMT3A y DNMT3B).

La DNMT1 tiene una elevada afinidad por el DNA hemimetilado y se encarga de mantener el patrón de metilación durante la replicación del material genético utilizando como molde la hebra de origen^{96,97}. Su expresión está muy generalizada durante la proliferación, siendo mayor en la fase S de síntesis y escasa en células que no están en división. La acción de esta enzima se estimula por la actividad de la DNMT3A al empezar a metilar DNA sin modificar. A pesar de considerarse una DNMT de mantenimiento, a la DNMT1 también se le atribuye un papel en la metilación *de novo* de ciertas secuencias repetitivas y de copia única⁹⁸, del mismo modo que se postula como la responsable de la metilación *de novo* de genes en procesos cancerígenos⁹⁹. También se cree que la DNMT1 está implicada en la reparación del DNA asociándose con proteínas MMR (*mismatch repair*). Los ensayos con ratones *knockout* en DNMT1 muestran su importancia en la viabilidad de los ratones, ya que los embriones homocigotos presentaban retraso en el desarrollo y morían a mitad de la gestación¹⁰⁰.

Por otro lado, DNMT3A y DNMT3B presentan la misma afinidad por el DNA hemimetilado y sin metilar por lo que son las encargadas de establecer la metilación *de novo*, metilando dinucleótidos CpG sin necesidad de molde. Son las responsables de establecer el patrón de metilación del DNA durante la gametogénesis y la embriogénesis temprana¹⁰¹, siendo mayor su expresión en tejidos embrionarios. La expresión de DNMT3A es más generalizada, pudiendo ser detectada en la mayoría de

los tejidos adultos, en cambio, la expresión de DNMT3B es menor salvo en testículos, tiroides y medula ósea¹⁰². Estas proteínas tienen distintas funciones en el desarrollo embrionario. DNMT3A metila genes y secuencias en fases tardías del desarrollo embrionario y después del nacimiento, mientras que DNMT3B lo hará en estadios tempranos del desarrollo. Estudios con ratones *knockout* para las DNMT3 demostraron que la DNMT3A es imprescindible para la diferenciación celular, ya que aunque los ratones nacían estos morían a las 4 semanas, mientras la DNMT3B es imprescindible en el desarrollo temprano como se comprobó al no presentar individuos viables¹⁰¹. Las DNMT3 también contribuyen al mantenimiento de los patrones de metilación de células diferenciadas^{103,104}. Recientemente, se ha identificado una nueva DNMT *de novo* denominada DNMT3C en células germinales de ratón, especializada en la metilación de retrotransposones¹⁰⁵.

La DNMT3L es una enzima sin dominio catalítico que coopera con las DNMTs *de novo*. Esta enzima se expresa mucho durante el desarrollo embrionario, pero en adultos su expresión queda reducida a células germinales y timo. Aunque la DNMT3L no posee dominio catalítico, va a interactuar con DNMT3A y DNMT3B estimulando su actividad metiltransferasa, no así con DNMT1¹⁰⁶. Esta proteína juega un papel muy importante en el *imprinting* génico, en la metilación de transposones y en la inactivación del cromosoma X^{107,108,109}.

Por último, la DNMT2 que a pesar de pertenecer a la familia de las DNA metiltransferasas no presenta esta actividad enzimática, aunque se ha relacionado su actividad con la metilación de RNA^{110,111}. También se cree que participa en el reconocimiento de daño del DNA, recombinación y reparación de mutaciones¹¹².

La actividad de las DNMTs se regula de varias maneras: mediante interacciones moleculares, como sucede con la DNMT3L, que actúa como cofactor de la DNMT3A uniéndose dos a dos formando un complejo que posee una mayor afinidad por el DNA y provocando una metilación más efectiva¹¹³; mediante modificaciones post-traduccionales como las que sufre la DNMT1 que puede ser metilada y fosforilada en diferentes residuos por otras enzimas, lo que puede provocar su degradación¹¹⁴⁻¹¹⁶; y por último, por *splicing* alternativo como el que se da en el gen que codifica para DNMT3B cuyas isoformas se cree que tienen diferentes actividades enzimáticas¹¹⁷.

La función más ampliamente conocida de las DNMTs es la regulación de la expresión génica, concretamente se las relaciona con el silenciamiento de la transcripción. Esta función se lleva a cabo mediante dos mecanismos: por la acción de

las proteínas de unión a DNA (MBD) que se unen al DNA cuando está metilado y reclutan enzimas modificadoras de histonas y complejos remodeladores de cromatina, lo que conjuntamente va a provocar el silenciamiento génico. Es el caso de MeCP2, la primera MBD identificada, que se une a DNA metilado y recluta complejos proteicos que contienen entre otras histonas desacetilasas (HDACs) que van a provocar la condensación de la cromatina impidiendo de esta manera la interacción de factores de transcripción, así como del resto de la maquinaria transcripcional^{118,119}. Además, la unión de MBDs al DNA metilado evita que lo hagan factores de transcripción que poseen esta capacidad¹²⁰. El otro mecanismo consiste en impedir la unión de proteínas reguladoras o factores de transcripción a las secuencias de DNA que reconocen como consecuencia de la presencia de grupos metilos, tal como sucede con el factor de transcripción AP-2 cuando su sitio de unión al gen de la proencefalina está metilado¹²¹. Pero este mecanismo no está generalizado, ya que existen factores de transcripción capaces de unirse a CpGs metiladas, como sucede con SP1, MTF-1, OCT4 y Krox-20¹²²⁻¹²⁴, lo que abre la puerta a una posible función de las DNMTs en la activación transcripcional. En este sentido, estudios recientes han asociado la actividad de la DNMT3A y la DNMT3B con la activación de los *enhancers* postulándose dos modelos: por un lado, que sea un factor de transcripción el que reclute a la DNMT3 para que metile el *enhancer* y este se hidroximetile por acción de la TET2 o que el sustrato para el FT sea el DNA hidroximetilado por lo que previamente tenga que ser metilado por las DNMT3 y seguidamente hidroximetilado.

4.1.1.2. Demetilación del DNA

La demetilación del DNA, aunque no es un proceso tan generalizado, es necesario en el cigoto y en células germinales primordiales. Esta pérdida de metilación se lleva a cabo, tanto de manera pasiva como activa. La demetilación pasiva sucede durante la replicación del DNA, cuando se ha de mantener el patrón de metilación por parte de la DNMT1, si esta enzima no está presente o no es capaz de realizar su función las citosinas de la nueva hebra de DNA quedarán sin metilar, por lo que los niveles de metilación en sucesivas divisiones se verán disminuidos. Sin embargo, hay procesos como la demetilación del genoma paterno justo después de la fertilización, donde la ausencia de replicación hacia poco factible que esta se produjera por demetilación pasiva^{125,126}.

Aunque se realizaron muchos estudios y hubo muchas propuestas de posibles demetiladoras y mecanismos por los que se podía producir esta demetilación activa, ninguno de los hallazgos resultó concluyente hasta el descubrimiento de las *ten-eleven*

translocation (TET)^{127,128}. Estas enzimas catalizan la conversión de la 5-metilcitosina (5mC) a 5-hidroximetilcitosina (5hmC), dando como resultado final la demetilación de la citosina a través de sucesivas oxidaciones y reparación por escisión de bases mediado por una timina glicosilada de DNA (TDG). Posteriormente se ha demostrado la capacidad de las TET de oxidar además, la hidroximetilcitosina (5hmC), la 5-formilcitosina (5fC) y la 5-carboxilcitosina (5caC), que actúan como intermediarios de la demetilación del DNA¹²⁹ (figura 1.9). Sin embargo, estas moléculas no son meros intermediarios, sino que se han detectado también como marcas epigenéticas estables con distinta distribución en secuencias repetitivas y en *enhancers* activos como en los específicos de tejidos, indicando un papel en el desarrollo embrionario^{130,131}. Además, se han identificado proteínas de unión específicas a cada uno de estos intermediarios entre los que están factores de transcripción, proteínas encargadas de la reparación del DNA y modificadoras de la cromatina, todo esto parece indicar que estas formas oxidadas de la 5mC deben tener funciones reguladoras y no ser simples intermediarios^{130,132,133}.

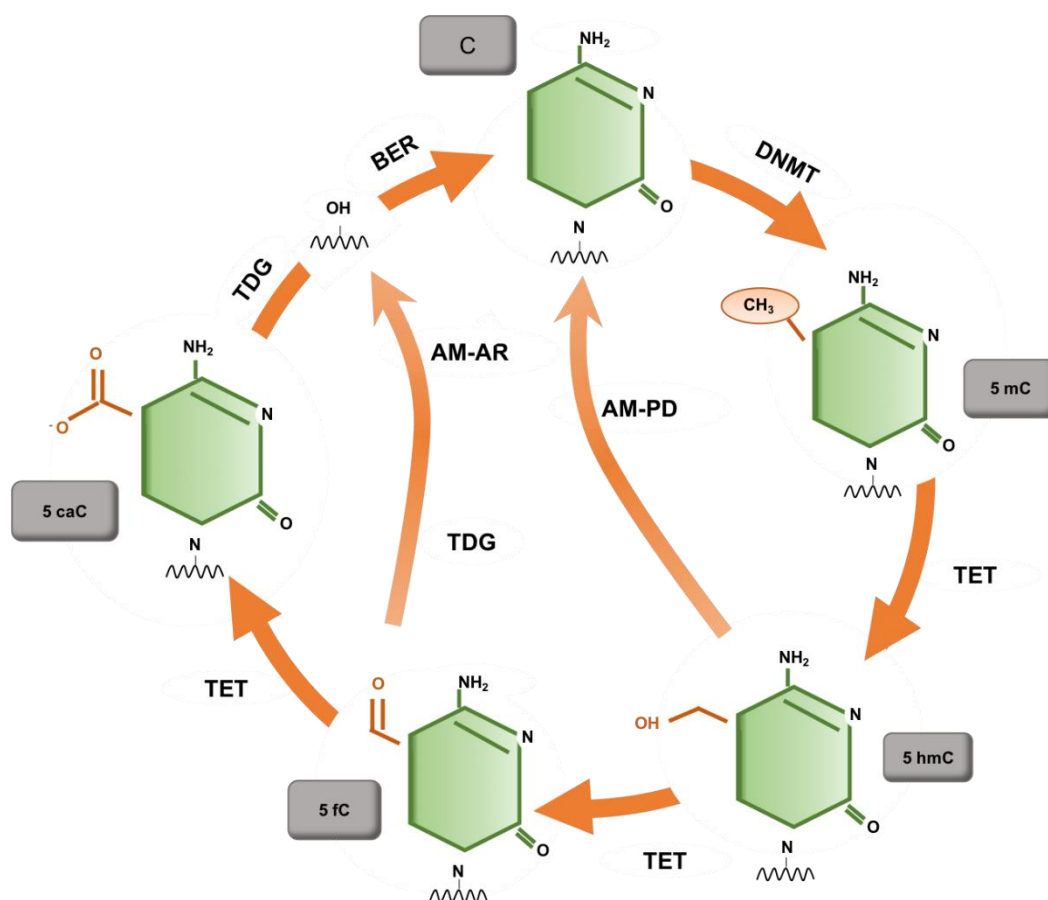


Figura 1.9. Vías de las TET para la demetilación del DNA. Las citosinas (C) son metiladas por acción de las DNMTs a 5mC. Estas 5mC pueden oxidarse repetidamente por la acción de las TET dando lugar a los intermediarios de la demetilación, 5hmC, 5fC y 5caC. Estas formas oxidadas de la

citocina pueden seguir vías de modificación activa y dilución pasiva (AM-PD) donde la metilación se irá diluyendo en las sucesivas replicaciones, o vías de modificación activa y restauración activa (AM-AR) gracias a procesos de reparación de escisión de base (BER) mediante TDG (timidina DNA glicosilasa) convirtiéndose nuevamente en citosina¹³⁴.

Las TET, de las que se conocen tres formas, son unas proteínas de la superfamilia de las 2-oxoglutarato dioxigenasa dependiente de hierro II (2OGFeDO). Estas tres proteínas presentan la misma actividad catalítica, aunque distinto patrón de expresión. La TET3 está muy expresada en oocitos y cigotos de ratones, pero su expresión disminuye durante el desarrollo en el blastocito, al contrario que TET1 y TET2 que están más expresadas en blastocitos y en células embrionarias (ESCs). Por otro lado, en la diferenciación de células germinales disminuye la expresión de TET1 manteniéndose constantes las de TET2 y TET3. Finalmente, TET2 está muy expresada en tejidos adultos, como en líneas neuronales y hematopoyéticas. Todas ellas realizan la misma actividad catalítica, pero no todas desempeñan las mismas funciones. TET1 y TET2 demetilan *loci* específicos de las células germinales primordiales y el *imprinting* génico. TET3 en cambio demetila el genoma paterno tras la fecundación, de ahí sus elevados niveles en oocitos y cigotos¹³⁵.

Mediante estudios en modelos de ratones *knockout* de cada una de las TET se ha demostrado que TET3 es una enzima de vital importancia durante la embriogénesis, cuya ausencia no puede ser compensada ni por TET1 ni TET2¹³⁵. Por otro lado, se ha probado que la ausencia de TET1 y TET2 provocan alteraciones epigenéticas que producen defectos muy diversos durante el desarrollo y la embriogénesis¹³⁶. Finalmente, la ausencia de TET1, TET2 y TET3 ha demostrado que la actividad combinada de las tres enzimas es imprescindible para el desarrollo embrionario¹³⁷.

Además del papel de las TET en la demetilación activa del DNA, se cree que también puede tenerlo en la pasiva, dado que los intermediarios producidos por estas enzimas no son reconocidos por la DNMT1 como metilados, y por lo tanto durante la replicación del DNA no metila el residuo correspondiente en la hebra hija¹³⁸.

4.1.2. Modificación de histonas

Las histonas son unas pequeñas proteínas básicas altamente conservadas a lo largo de la evolución con un núcleo globular y una región N-terminal rica en aminoácidos básicos como la arginina y la lisina, que son susceptibles de sufrir modificaciones covalentes, aunque también se pueden modificar algunos residuos localizados en el núcleo globular. Estas proteínas son las responsables del

empaquetamiento del DNA formando los nucleosomas, unidad fundamental de la cromatina. Los nucleosomas están formados por un octámero de histonas, compuesto por dos copias de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, sobre el que se enrolla un fragmento de 146 pares de bases de DNA. Pero la función de las histonas no es solo estructural, siendo imprescindibles en la organización de la cromatina, sino que juegan un papel importante en la regulación dinámica de la transcripción, de la replicación, de la reparación y en la recombinación del DNA. Las histonas desempeñan esta gran variedad de funciones gracias al amplio abanico de modificaciones que sufren y que regulan la funcionalidad de la cromatina de dos maneras principalmente: por un lado, afectando directamente a la interacción entre histonas o de las histonas con el DNA, y por otro lado influyendo en la relación con las proteínas que son capaces de interpretar las modificaciones post-traduccionales de histonas¹³⁹.

Se conocen un gran número de modificaciones de histonas, siendo las más conocidas la acetilación, la metilación y la fosforilación¹⁴⁰. Debido a la gran variedad de modificaciones tanto de posición como de naturaleza y tomando en consideración los diferentes significados biológicos que pueden tener, se postuló la hipótesis del “código de las histonas” que al ser leído por otras proteínas producirán una inhibición o una activación de la transcripción¹⁴¹ (figura 1.10).

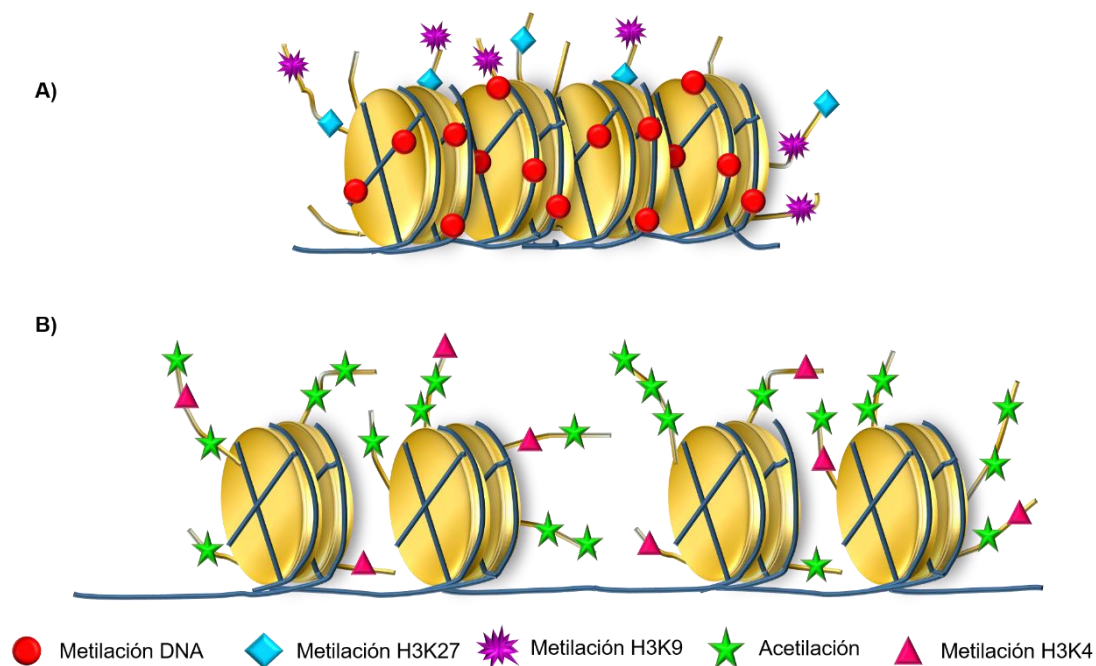


Figura 1.10. Esquema de las modificaciones post-traduccionales en histonas. Las modificaciones se producen principalmente en los extremos amino-terminales de las histonas. Estas marcas serán reconocidas por diferentes complejos proteicos implicados en diferentes procesos,

como en la regulación de la actividad transcripcional. (A) Estado condensado de la cromatina debido a la acción conjunta de la metilación del DNA, la metilación de H3K27 y H3K9. (B) Estado relajada de la cromatina debido a la acetilación de las histonas, la metilación de H3K4 y la falta de metilación del DNA.

4.1.2.1. Acetilación de las histonas

La modificación post-traducciona de las histonas descubierta hace más de 50 años es la acetilación histonas, cuyo papel se asoció inicialmente con la síntesis de RNA¹⁴². Estudios posteriores la han relacionado con la activación de la transcripción y con la remodelación de la cromatina. La acetilación consiste en la adición de grupos acetilo a los residuos de lisina de las colas de las histonas, neutralizando la carga positiva de este aminoácido lo que debilita las interacciones electrostáticas entre las histonas y el DNA. Esto induce un estado más relajado de la cromatina haciendo que el DNA sea más accesible y permitiendo el acceso de diferentes moléculas para poder llevar a cabo procesos como la replicación, reparación del DNA y la transcripción¹⁴⁰.

La acetilación de las histonas es un proceso reversible y dinámico que está regulado por dos familias de proteínas que realizan acciones contrapuestas: las histonas acetiltransferasas (HATs) que acetilan las colas de las histonas; y las histonas desacetilasas (HDACs) que eliminan los grupos acetilo. Por lo general estas enzimas no actúan solas, sino que forman parte de complejos multiproteicos, que van a determinar la especificidad del sustrato y la lisina sobre la que realizar su acción.

Las HATs, también denominadas KAT por el residuo al que acetilan (*lisina "K"*), catalizan la transferencia de un grupo acetilo, donado por el acetil-coenzima A, al grupo amino épsilon de la lisina¹⁴³. Estas enzimas se dividen en dos grupos, las B HATs que son las enzimas citoplasmáticas que modifican a las histonas libres después de ser sintetizadas en el citoplasma¹⁴⁴ y las A HATs que se encuentran en el núcleo acetilando tanto histonas como proteínas no histonas en el núcleo¹⁴⁵. En humanos se conocen 18 acetiltransferasas, que se clasifican basándose en su secuencia de homología, en tres familias, GNAT, CBP/p300 y MYST¹⁴⁶.

La actividad de las HATs se regula de dos maneras: a través de interacciones con proteínas que forman parte de complejos proteicos a los que pertenecen, que además de modular su actividad catalítica regulan su afinidad por el sustrato, como sucede con la proteína recombinante Gcn5/PCAF que solamente es capaz de acetilar nucleosomas cuando forma parte de estos complejos^{147,148}; o mediante la autoacetilación de las mismas, proceso observado en proteínas de las familias p300/CBP, Rtt109 y MYST. En cada una de ellas la forma hiperacetilada está

relacionada con la forma activa de la enzima y la hipoacetilada con la inactiva¹⁴⁹, pero el mecanismo de autoacetilación es diferente para cada una de las familias¹⁵⁰.

Por otro lado, las HDACs son las proteínas que revierten la acetilación de las histonas. De estas se conocen 18 enzimas divididas en cuatro clases: Clase I, que incluye HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8, y se localizan tanto en núcleo, como en el citoplasma y en orgánulos especializados; la Clase II cuenta con HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 y HDAC10, y se encuentran en el núcleo y en el citoplasma; la clase III formada por SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6 Y SIRT7 su ubicación puede ser nuclear, citoplásmica y mitocondrial; y la Clase IV formada por HDAC11 que es la menos estudiada¹⁵¹.

Las HDACs tienen como sustrato tanto histonas como proteínas no histonas como p53¹⁵². Estas enzimas no son muy específicas por lo que ante la ausencia de alguna de ellas otra puede realizar su función. Al igual que las HATs, las HDACs forman parte de complejos multiproteicos que serán determinantes para definir su especificidad de sustratos¹⁵³.

Estas enzimas están implicadas en procesos vitales para las células, por lo que su actividad está estrechamente regulada. El mecanismo mejor conocido es la regulación mediante la interacción proteína-proteína, ya que las HDACs forman parte de complejos multiproteicos y van a requerir de otras subunidades como cofactores para ser activas. En este sentido, se ha demostrado una baja actividad enzimática de HDAC1 y HDAC2 cuando se purifican como proteínas aisladas¹⁵⁴. Otro mecanismo es por modificaciones post-traduccionales, como acetilación, ubiquitinación, glicosilación, nitrosilación, sumoilación y fosforilación, siendo esta la más estudiada. La fosforilación se da principalmente en residuos de serina afectando a la actividad, a la formación de complejos proteicos¹⁵⁵ y a la localización subcelular; por ejemplo, HDAC4 queda secuestrada en el citoplasma cuando está fosforilada en determinados residuos de serina. Recientemente se ha demostrado que las HDACs también se fosforilan en residuos de tirosina lo que también podría resultar relevante respecto a su función. Concretamente, se ha demostrado que la tirosina quinasa c-Abl fosforila residuos de tirosina en HDAC2 afectando a la estabilidad y a la actividad de la enzima¹⁵⁶. Otras maneras de regulación son por disponibilidad de cofactores, mediante el control de su expresión, *splicing* alternativo del RNA y mediante procesamiento proteolítico.

Tanto las HATs como las HDACs son de gran importancia a nivel biológico, ya que las alteraciones que sufren pueden ser responsables del desarrollo de

enfermedades como el cáncer, enfermedades neurológicas, desordenes metabólicos, inflamatorios, cardíacos y pulmonares^{157,158}.

La acetilación de histonas no solo regula la expresión génica mediante cambios en el grado de compactación de la cromatina, sino que también son reconocidas por proteínas que contiene bromodominios, como factores de transcripción, complejos remodeladores de la cromatina, lisina acetiltransferasas y metiltransferasas, que son necesarias para la activación de la transcripción. Por el contrario, la desacetilación de las histonas permite que las interacciones entre DNA e histonas sean mayores, y, por lo tanto, que el DNA este más condensado lo que impide la unión de la maquinaria transcripcional^{159,160}.

Otro de los procesos regulados por la acetilación de histonas es el ensamblaje de los nucleosomas tras la replicación del DNA durante la fase S del ciclo celular. En este momento también se sintetizan histonas nuevas, que se transportan al núcleo gracias a las chaperonas, para lo que es necesaria la diacetilación de los residuos de lisinas 5 y 12 de la histona H4 (H4K5ac y H4K12ac)^{161,162}. Se ha demostrado que, en las levaduras en gemación, el dímero H3-H4 se acetila en la lisina 56 de la histona H3 (H3K56ac), además de en las lisinas 9 y 27 (H3K9 y H3K27) lo que regula el ensamblaje de los nucleosomas al intervenir en las interacciones entre histonas y chaperonas como Asf-1 y CAF-1¹⁶³⁻¹⁶⁶. Una vez que están ensambladas con el DNA se desacetilan para posteriormente volver a acetilarse de acuerdo al patrón que debería poseer para realizar sus diferentes funciones¹⁶⁷⁻¹⁶⁹.

Por último, una de las funciones que se ha atribuido recientemente a la acetilación de histonas es la regulación del pH intracelular. McBrian *et al.* observaron que cuando este pH disminuía, las histonas se desacetilaban y los aniones acetato liberados eran expulsados de la célula junto con protones previniendo de esta manera la bajada del pH, por el contrario, la acetilación de las histonas aumentaba cuando lo hacía el pH¹⁷⁰.

4.1.2.2 Metilación de las histonas

La metilación de histonas se relaciona con los procesos de regulación de la estructura de la cromatina, la transcripción, la reparación del DNA y el *splicing* alternativo. Tiene lugar en residuos de lisina, arginina e histidina del extremo amino terminal de las histonas H3 y H4 fundamentalmente. Las lisinas (K) pueden estar monometiladas (me1), dimetiladas (me2) o trimetiladas (me3) en su grupo ϵ -amino, en cambio las argininas (R) pueden estar monometiladas (me1), dimetiladas

simétricamente (me₂s) o dimetiladas asimétricamente (me₂a) en su grupo guanidil. Las histidinas, por su parte, son las menos estudiadas y se ha visto que pueden encontrarse monometiladas¹⁷¹.

La metilación de residuos de lisina, a diferencia de la acetilación, no está relacionada con activación de la transcripción, sino que puede estar asociada a la activación o represión transcripcional en función del residuo metilado y el grado de metilación que presente, aunque puede suceder que la misma modificación realice funciones opuestas dependiendo de la proteína efectora que reconozca esta marca. De este modo, las modificaciones relacionadas con activación de la transcripción son la metilación de las lisinas H3K4, H3K36 y H3K79, mientras que H3K9, H3K27 y H3K20 son modificaciones ligadas a la inhibición de la transcripción¹⁴⁰. Así, la monometilación (H3K4me₁) se encuentra en regiones reguladoras, los denominados *enhancer*¹⁷², de genes que se están expresando mientras que la trimetilación de H3K4 (H3K4me₃) se encuentra en la región promotora activando la transcripción. Sin embargo, esta última marca, junto con H3K4me₂, cuando son reconocidas por la proteína ING2 (proteína inhibidora del crecimiento 2) se asocia con represión transcripcional¹⁷³. Por otro lado, la dimetilación de H3K79me₂ es importante en la regulación del ciclo celular, mientras que la trimetilación (H3K9me₃) está relacionada con la vía de señalización WNT^{174,175}.

La metilación de las histonas no provoca cambios en la carga de la cromatina, por lo que el efecto que produce sobre la expresión génica no se debe a cambios de interacción de las histonas con el DNA, sino a las proteínas que reconocen cada modificación¹⁷⁶. En este sentido, se ha demostrado que la H3K9 metilada es reconocida por la proteína de heterocromatina 1 (HP1) y ambas cooperan estableciendo regiones de heterocromatina^{177,178}. Por otro lado, la metilación de la H3K4 es reconocida por HATs y complejos remodeladores de la cromatina impidiendo el reclutamiento de DNMTs, favoreciendo así la transcripción^{179,180}. Estos datos apuntan la importancia que tienen las proteínas que reconocen las modificaciones de las histonas, ya que son estas las que interpretan el código de histonas, y por tanto, las responsables últimas del efecto de dicha modificación. Otro hecho a tener en cuenta es que las modificaciones epigenéticas cooperan entre sí, por lo que, marcas que tienen un efecto cuando aparecen aisladas pueden cambiar al coexistir con otras. En este sentido, se ha demostrado que la metilación de la H3K4 y la de la H3K27, que son marcas de activación y represión transcripcional, respectivamente, cuando coinciden van a cooperar preparando a los genes para que se dé la transcripción¹⁸¹.

Las enzimas que controlan el estado de metilación de las histonas son las histonas metiltransferasas (HMT) y las histonas demetilinasas (HDM). Las HMT se encargan de transferir grupos metilo, donados por S-adenosil-metionina (SAM)¹⁸², a la región amino de los residuos de lisinas y argininas. En humanos se han identificado más de 60 HMT, que se clasifican en función del residuo al que metilan, dividiéndolas, por tanto, en histonas lisina metiltransferasas (KMT), que metilan residuos de lisina, y en proteínas arginina metiltransferasas (PRMT), que metilan argininas. Estas enzimas, en comparación con las acetiltransferasas, son muy específicas en cuanto al residuo al que van a metilar¹⁸³ y pueden metilar a histonas que forman parte de la cromatina, a histonas libres y a proteínas no histonas¹⁸⁴.

Por otro lado, las HDM no se identificaron hasta 2004, demostrándose así la reversibilidad de la metilación de histonas, además de la importancia de las reacciones de oxidación en este proceso¹⁸⁵. Estas enzimas son específicas tanto del residuo que demetilan como del grado de metilación que esté presente. Las HDM se dividen en enzimas amino oxidasas dependientes de FAD (flavin adenin dinucleótido) que demetilan residuos mono y dimetilados como la enzima LSD1, primera en ser descubierta¹⁸⁵, y las JmjC Fe(II) que demetilan independientemente del grado de metilación que presenten (mono-, di- y trimetilados)¹⁸⁶.

Estudios en los últimos años han demostrado que las demetilinasas desempeñan un papel en el control de la expresión génica, en el estado de la cromatina, en procesos de replicación y reparación del DNA, además de en la diferenciación celular y en el control del ciclo celular¹⁸⁷. También hay evidencias de que demetilan proteínas no histonas regulando los niveles de dichas proteínas y su estabilidad como por ejemplo la DNMT1 cuya estabilidad depende de LSD1, por lo que también se puede decir que las demetilinasas están implicadas en el control de la metilación del DNA¹¹⁴.

4.1.2.3. Fosforilación de histonas

La fosforilación de histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4) es un proceso muy dinámico que se da en residuos de serina, treonina y tirosina, y está regulado por la acción contrapuesta de proteínas quinasas y fosfatasas (Tabla 1.2). Las quinasas se encargan de añadir grupos fosfato y las fosfatasas de quitarlos, alterándose así la carga de las histonas e influyendo sobre la estructura de la cromatina¹⁸³. No se conoce mucho sobre cómo se reclutan estas enzimas a sus sitios de acción, pero se sabe que algunas de estas quinasas poseen dominios de unión al DNA como MAPK1¹⁸⁸. Este proceso también podría verse favorecido por otros factores, como factores de unión a

cromatina¹⁸³. Esta modificación está implicada en la reparación del DNA, en la remodelación de la cromatina y en la regulación de la actividad transcripcional. Para llevar a cabo estos procesos la fosforilación de histonas trabaja junto con el resto de las modificaciones de histonas. La fosforilación en residuos de la histona H3 (H3S10, H3S28, H3T3 y H3Y11) está asociada por un lado con la activación génica, mientras que en presencia de otras marcas se asocia con la condensación de la cromatina durante la mitosis. En este sentido, se ha demostrado que la fosforilación de la serina 10 de la histona H3 (H3S10p) afecta directamente a los niveles de acetilación de H3K9ac y H3K14ac¹⁸⁹, además de inducir la activación transcripcional al interactuar con H4K16ac¹⁹⁰. También se ha demostrado que cuando la H3K9 está metilada, la fosforilación de H3S10 provoca que se disocie la HP-1 lo que afecta al estado de condensación de la cromatina¹⁹¹. Por esto no podemos considerar la fosforilación de un único residuo un evento independiente, de hecho, el efecto final será diferente dependiendo del contexto celular en el que tenga lugar, su relación con otras modificaciones de histonas y su interacción con complejos reguladores de la transcripción el efecto final será diferente.

También se ha estudiado el papel de la fosforilación de tirosinas en la regulación de la transcripción. Por un lado, se ha demostrado que la fosforilación de la tirosina 41 de la histona H3 (H3Y41), por parte de JAK2 provoca la liberación de la proteína de heterocromatina HP1 α favoreciendo que la cromatina adquiera una conformación transcripcionalmente activa¹⁹². Además, se observó que los promotores que presentaban fosforilada la H3Y41 también tenían metilada H3K4me3, lo que indica que esta marca de fosforilación se encuentra en genes transcripcionalmente activos¹⁹³ (figura 1.14). Por otro lado, también se ha relacionado esta modificación con la atenuación de la transcripción, concretamente se ha demostrado que la fosforilación de la Y37 de la histona H2B en la fase S del ciclo celular regula la expresión genes que codifican para histonas¹⁹⁴.

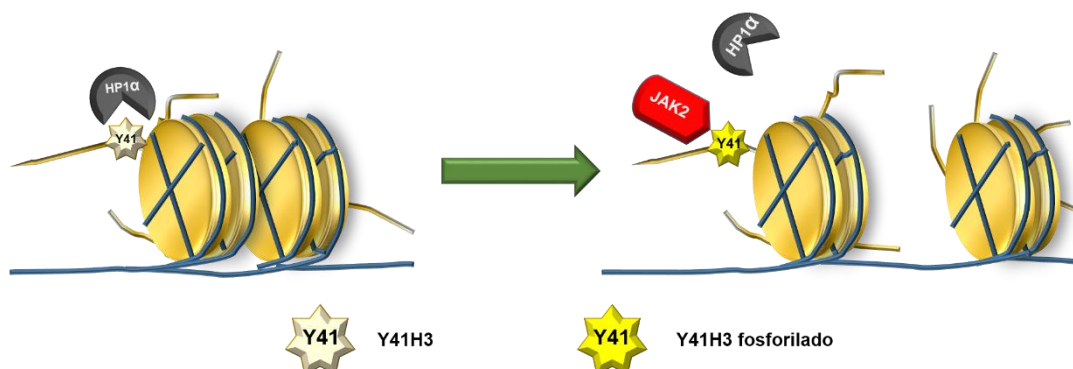


Figura 1.11. Activación transcripcional mediada por la acción de JAK2. Mecanismo por el que JAK2 estimula la activación transcripcional al entrar en el núcleo y fosforilar la tirosina 41 de la histona H3 (H3Y41) provocando que la cromatina se libere de su interacción con HP-1 α .

4.2. Relación entre los responsables de las modificaciones epigenéticas

Los distintos procesos epigenéticos no deben considerarse de manera individual ya que interactúan entre sí de una manera coordinada para regular la estructura y función de la cromatina, esta combinación de modificaciones es el denominado “código epigenético”. Un claro ejemplo de la colaboración entre todas las modificaciones epigenéticas se observa durante el desarrollo embrionario, donde tras producirse una demetilación masiva del DNA y una reorganización de las marcas de histonas tras la fecundación, han de reestablecerse nuevamente. Antes de que se metile el DNA nuevamente, por parte de las DNMT3A y DNMT3B, la RNA polimerasa II, unida al principio de los genes que han de expresarse, recluta HMT responsables de la metilación de la H3K4 y se establecen los patrones de metilación en las histonas asociadas con las islas CpGs, de tal manera que las islas CpGs presentan H3K4 metiladas quedando protegidas de la acción demetilasa de las DNMT3A y DNMT3B. Por ello, la metilación del DNA *de novo* se produce en todo el genoma excepto en los promotores debido a la presencia de la H3K4me, que impide la unión del complejo DNMT3L/DNMT3A/DNMT3B. El patrón de metilación determinado hasta este momento es el que presenta una célula pluripotente, pero para que estas células se diferencien se deben silenciar genes encargados del mantenimiento de la pluripotencialidad como *Oct3/Oct4*. Para ello se reclutan factores de transcripción que interaccionan con complejos que contiene la HMT G9a y enzimas con actividad desacetilasa, que metilan y desacetilan, respectivamente H3K9, permitiendo la unión de HP-1 que aumenta la condensación de la cromatina. Seguidamente el complejo que contiene G9a recluta a las DNMTs 3A y 3B que metilan el promotor¹⁹⁵. Pero la cooperación entre las modificaciones epigenéticas no se reduce a los primeros estadios del desarrollo, sino que están presentes tanto en condiciones fisiológicas normales como en patologías como el cáncer. Así mismo, Viré *et al.* demostraron que la proteína EZH2, una HMT que forma parte de los complejos *Polycomb* y metila a la H3K27, que es una modificación epigenética relacionada con la represión transcripcional, interacciona con DNMTs dirigiendo la metilación del DNA a determinados promotores¹⁹⁶.

También existe una relación entre la metilación del DNA y las modificaciones de histonas a través de las MBD, que reconocen DNA metilado y reclutan complejos

proteicos con HDACs y HMT contribuyendo a la represión transcripcional¹⁹⁷ como sucede con MeCP2 que se asocia con la HMT Suv39h y metila a H3K9¹⁹⁸.

Todo esto indica que el establecimiento, el mantenimiento y la regulación de todas las modificaciones epigenéticas es clave para el funcionamiento normal de las células, y que una desregulación de estas puede desencadenar enfermedades como el cáncer.

4.3 Epigenética y cáncer de próstata

El cáncer se ha definido de diversas maneras dependiendo del área de estudio. Este término engloba un gran abanico de enfermedades cuyo denominador común es la desregulación de vías importantes para el control de la homeostasis celular. Los seis signos distintivos del cáncer son la proliferación descontrolada, provocada por la pérdida de expresión y/o función de los supresores de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inducción de la angiogénesis, activación de la invasión y metástasis¹⁹⁹. Durante muchos años los estudios se centraron en desentrañar las alteraciones genéticas (mutaciones puntuales, translocaciones y deleciones) responsables del desarrollo del cáncer. Sin embargo, el entendimiento de estas enfermedades requiere, también, su abordaje desde un punto de vista epigenético ya que una de las características de las células cancerígenas radica en la pérdida del equilibrio epigenético que existe en células normales.

Las tres principales alteraciones en las modificaciones epigenéticas asociadas al desarrollo y progresión del cáncer incluyen cambios en la metilación del DNA, modificaciones post-traduccionales de las histonas y microRNAs. A continuación, se van a describir las dos primeras con más detalle centrándonos en las modificaciones que se producen en el desarrollo y progresión del cáncer de próstata tal como se muestra en la figura 1.13.

4.3.1 Alteraciones en la metilación del DNA en cáncer de próstata

Una de las modificaciones mejor estudiadas son las alteraciones que sufre el patrón de metilación del DNA⁹². En células cancerígenas se produce una hipermetilación de las islas CpG en la región promotora, principalmente de genes supresores de tumores, impidiendo su expresión y su papel protector en el desarrollo del tumor. Paralelamente, se produce una hipometilación global del genoma que afecta principalmente a secuencias repetitivas, elementos endógenos retrovirales y retrotransposones que contribuyen a la inestabilidad genómica²⁰⁰ (figura 1.12).

En cáncer de próstata la hipermetilación del DNA se produce en la región promotora de genes implicados en procesos celulares esenciales y en genes supresores de tumores que en condiciones normales no están metilados. Además, la 5'-metil citosina es muy inestable y muta a timina, por lo que en ocasiones los sitios CpGs metilados se degradan en TpG/CpA²⁰¹. Esta metilación anómala contribuye al fenotipo tumoral al desregularse procesos como la reparación del DNA (*Gstp1* y *MGMT*²⁰²), la adhesión celular (*CDH1*²⁰³ y *CD44*²⁰⁴), el control del ciclo celular (*ciclina D2/CCND2*²⁰⁵) y la apoptosis (*PYCARD*²⁰⁶), así como al inactivarse genes supresores de tumores (*APC*²⁰⁷, *RARβ*²⁰⁸, *RARRES1*²⁰⁹ y *RASSF1*²¹⁰), además de genes implicados en la respuesta hormonal (*AR* y *ER*) y en la respuesta inflamatoria (*2-PTGS2*²¹¹).

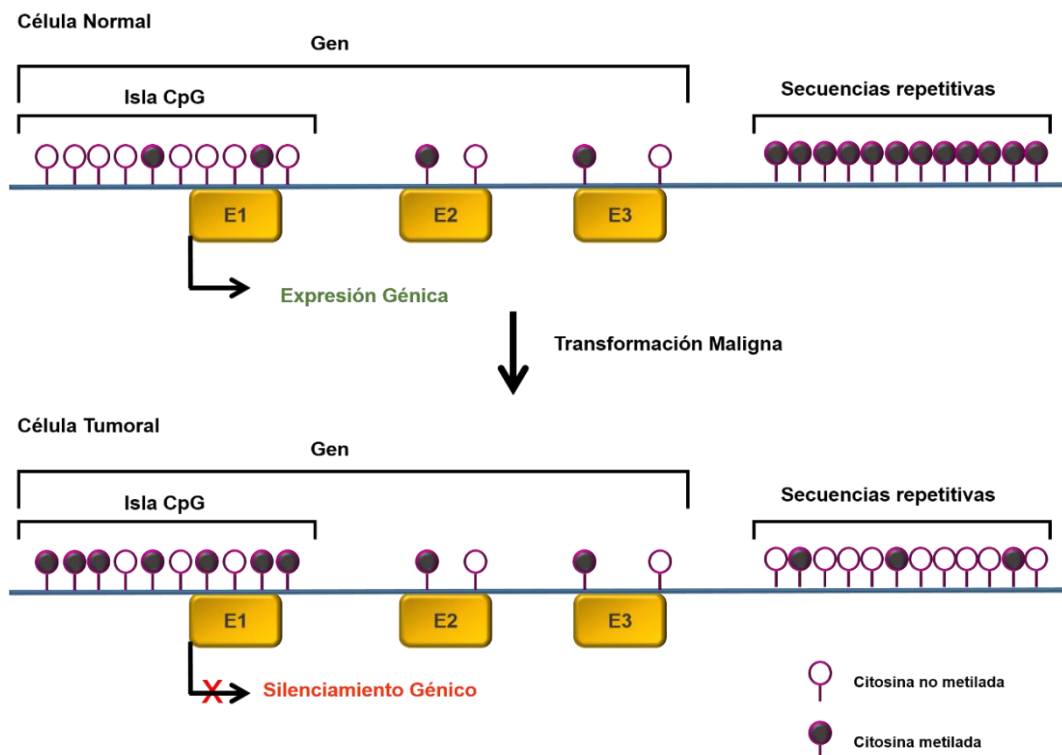


Figura 1.12. Perfil de metilación en una célula normal y una tumoral. Los sitios CpGs no metilados y metilados están indicados en blanco y negro, respectivamente. La figura representa la transformación del patrón de metilación de una célula normal a una célula tumoral, donde se produce una hipermetilación de los promotores y una hipometilación global del DNA lo que provoca inestabilidad genómica. Los símbolos E1, E2 y E3 representan los diferentes exones.

La hipermetilación del promotor de *Gstp1* es la alteración epigenética mejor caracterizada en cáncer de próstata hasta el momento, siendo el biomarcador epigenético mejor establecido, ya que se da en más del 90% de los casos y que su grado de metilación permite diferenciar entre los estadios de la enfermedad, llegando incluso a asociarse su metilación tras el tratamiento con la posibilidad de recurrencia

de la enfermedad. Además, es posible determinar de manera fiable el estado de metilación de este gen en fluidos corporales como suero, plasma y orina²¹²⁻²¹⁵.

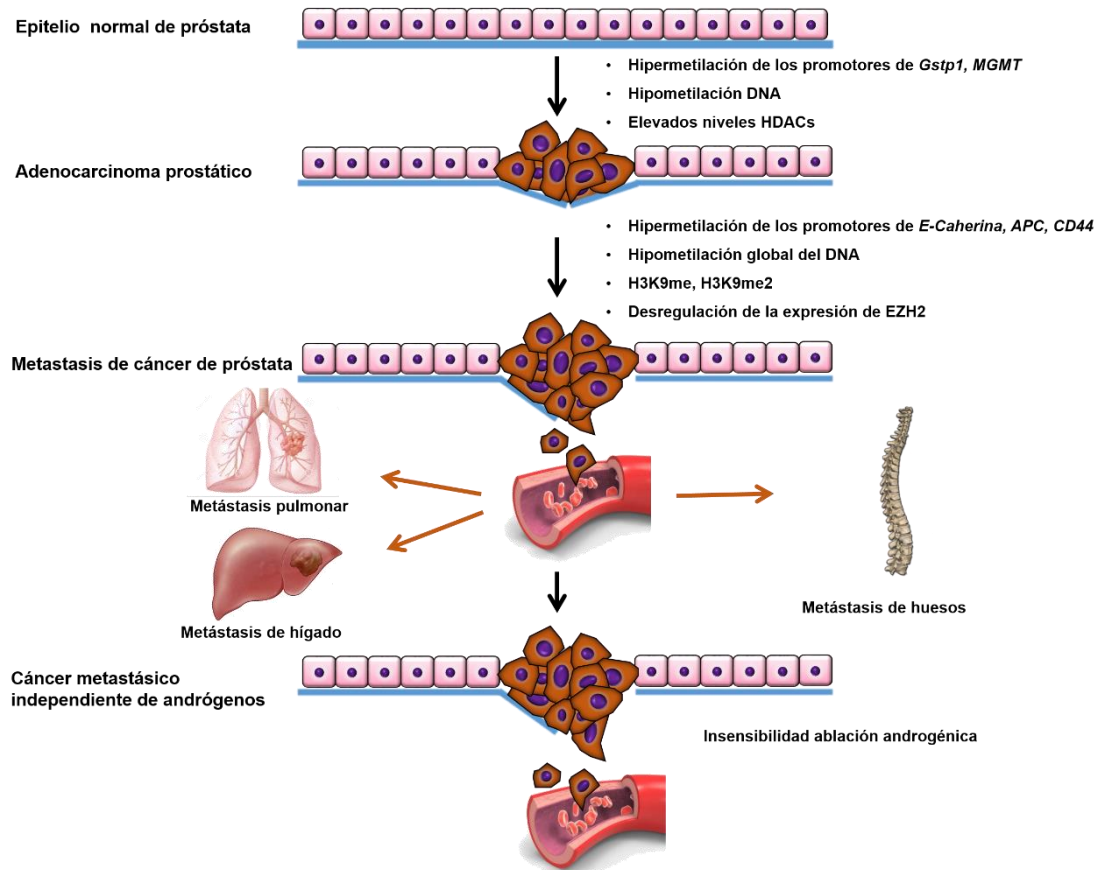


Figura 1.13. Alteraciones epigenéticas en el desarrollo y progresión del cáncer de próstata. Modificaciones epigenéticas como el silenciamiento de genes supresores de tumores por hipermetilación de sus promotores, la expresión aberrante de HDACs y la hipometilación del DNA son los responsables de la progresión del cáncer de próstata hasta estadios independientes de andrógenos²¹⁶.

Se ha demostrado que el perfil de metilación de genes supresores es específico para cada tipo tumoral. Esto no significa que cada gen está metilado específicamente en un solo tipo de tumor, sino que hay combinaciones de genes que son exclusivas de cada tipo tumoral. Esta característica, unida a la existencia de métodos que permiten estudiar el estado de metilación de genes determinados con una elevada especificidad y sensibilidad, incluso en muestras de fluidos biológicos, ha permitido utilizar esta alteración epigenética como biomarcador para el diagnóstico, evaluación del pronóstico y respuesta al tratamiento de los pacientes con cáncer. En este sentido, en estadios tempranos de la neoplasia también se ha descrito la hipermetilación de otros genes como *APC*, *MDR1*, *RASSF1α* y *PTGS2*, estando estos

dos últimos asociados a un mayor riesgo de recurrencia y una mayor agresividad del tumor²¹⁷. La metilación de *MGMT* está relacionada con el desarrollo del carcinoma prostático²¹⁸. La metilación de *CDH-1* en cáncer de próstata se asocia con la progresión e invasión tumoral, ya que favorece la transformación a un fenotipo metastásico, al igual que indica la metilación de *CD44* que en otros tipos de tumores es característica de la transición epitelio-mesénquima (EMT). Así como la metilación del gen que codifica para la ciclina D2 (*CCDN2*) que se correlaciona con una mayor agresividad del tumor. Del mismo modo, la metilación de *EphA5* se ha relacionado más frecuentemente con carcinomas prostáticos metastásicos²¹⁹ y que se ha propuesto la metilación conjunta de *CFTR* y *HTR1B* como un marcador de la agresividad del tumor²²⁰.

Por otro lado, la hipometilación global del DNA fue la primera alteración epigenética asociada con el desarrollo tumoral que, además, suele producirse en los primeros estadios del desarrollo del cáncer. Sin embargo, en cáncer de próstata este evento se produce en estadios avanzados, cuando la enfermedad presenta una mayor tendencia a metastatizar. En cáncer, esta alteración afecta fundamentalmente a secuencias repetitivas en regiones de heterocromatina, elementos transponibles y retrovirales que están silenciados por metilación en células normales, además de a regiones reguladoras de oncogenes y genes imprintados. Las consecuencias funcionales de esta pérdida de metilación son: reactivación de elementos transponibles que provocan inestabilidad genómica, como sucede con *Line-1*, que se ha encontrado hipometilado en un 49% de los cáncer de próstata avanzados con metástasis en nódulos linfáticos²²¹; sobreexpresión de protooncogenes y de factores de crecimiento responsables del desarrollo del cáncer²²², como es el caso de *MYC* en cáncer de próstata, lo que provoca un aumento del grado de invasividad del tumor; y la pérdida de *imprinting* genómico, como es el caso de *IGF2* cuya expresión en células normales es monoalélica, pero la pérdida de metilación del segundo alelo en algunos tipos tumorales conlleva un aumento de expresión y una proliferación descontrolada²²³.

En cáncer de próstata se ha descrito la hipometilación de oncogenes que promueven la progresión tumoral al favorecer procesos como la angiogénesis, migración e invasión celular y la degradación de la matriz (*PLAU*, *HPSE*)^{218,224}. Así como genes implicados en procesos de supervivencia celular, reparación de tejidos, crecimiento tumoral e invasión (*FGF6*)²²⁵. También, se han identificado genes hipometilados relacionados con la activación de cancerígenos (*CYP1B1*)²²⁶ y la activación transcripcional del *AR* (*NCOA4*)²²⁷.

Además, estudios recientes asocian la hipometilación del DNA con el pronóstico y diagnóstico en cáncer de próstata, demostrando así, que esta alteración es importante tanto en el desarrollo como en la progresión de esta patología. En este sentido se relaciona la hipometilación de *WNT5A*, *CRIP1* y *S100P* con una mayor agresividad del tumor y un peor pronóstico, además de con una posible recaída en la enfermedad tras la prostatectomía²²⁸⁻²³⁰. También se ha sugerido la pérdida de *imprinting* de *IGF2* en cáncer de próstata, como un posible biomarcador para la detección de la enfermedad²³¹.

4.3.2. Alteraciones en las modificaciones de histonas y en la maquinaria epigenética en cáncer de próstata

Los fallos en el mantenimiento de las marcas de histonas, junto con las alteraciones de metilación del DNA, son unos de los aspectos claves en el desarrollo y progresión tumoral. Estos cambios cobran diferentes significados biológicos en función del resto de marcas epigenéticas que los acompañan, además de depender de la región del cromosoma, del tipo de célula y del tejido en el que se encuentren²³². En la actualidad, se han descrito un gran número de alteraciones en las modificaciones de histonas en relación con la aparición de diferentes tipos de cáncer, así como con las diferentes etapas de la enfermedad.

Las alteraciones más estudiadas en el desarrollo y la progresión del cáncer son cambios en la acetilación de histonas y en la metilación de diversos residuos. Uno de los primeros cambios identificados en cáncer, que resulta ser un hecho frecuente de esta enfermedad, es la pérdida de acetilación de la lisina 16 de la histona H4 (H4K16ac) y de la trimetilación de la lisina 20 de la histona H4 (H4K20me3)²³³. Sin embargo, en cáncer de próstata las principales modificaciones observadas corresponden a alteraciones en la acetilación de lisinas de la histona H3 (H3K9, H3K18 y H3K12) y en la metilación de la arginina H4R3me2 y la lisina H3K4me2²³⁴, además de una disminución de la metilación de la H3K27 en regiones de DNA hipermetilado. Además, existen estudios que relacionan el aumento de la acetilación de la lisina 18 de la histona H3 (H3K18) con un mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad²³⁵.

Se han descrito numerosas alteraciones en las modificaciones epigenéticas relacionadas con la aparición y progresión del cáncer de próstata. Estas alteraciones, están provocadas, al menos en parte, por cambios en la expresión y actividad de las proteínas que las regulan, así como las que se encargan de su reclutamiento a las

secuencias reguladoras. En este sentido, se ha observado que en cáncer de próstata los genes más comúnmente mutados son los que codifican para proteínas relacionadas con las modificaciones epigenéticas como la metilación del DNA (TET, IDH1), modificaciones de histonas (MLL2 y KDM6A) y remodeladores de la cromatina (ASXL1 y ATRX) provocando la inactivación de dichas proteínas²³⁶⁻²³⁹.

Las alteraciones en la expresión y las mutaciones en los genes que codifican a las HDACs en cáncer están íntimamente relacionadas con la progresión y el desarrollo de esta enfermedad, debido a la transcripción aberrante de genes que regulan funciones esenciales en la célula como la proliferación celular, la regulación del ciclo celular y la apoptosis¹⁵¹. En este sentido, se ha demostrado que el tratamiento con inhibidores de HDACs produce una hiperacetilación tanto en células normales como en neoplásicas, aunque solamente en las células tumorales se induce la actividad proapoptótica y antiproliferativa²⁴⁰. También existen evidencias de como la pérdida de función de estas favorece el desarrollo de tumores, concretamente, Ropero *et al.* en 2006 demostraron que la pérdida de función de HDAC2 por mutación es de gran relevancia en el desarrollo de tumores con inestabilidad de microsatélites²⁴¹. En cáncer de próstata se ha demostrado un aumento de la expresión y la actividad de HDACs de clase I (HDAC1, HDAC2 y HDAC3), y la consiguiente disminución de los niveles de acetilación de las histonas H3 y H4, lo que favorece la proliferación de las células tumorales. En 2008, un análisis de muestras de carcinoma prostático mediante técnicas de inmunohistoquímica identificó un aumento de expresión de HDACs de clase I (HDAC1, 2 y 3), detectándose los mayores niveles en tumores desdiferenciados y con elevadas tasas de proliferación. Este análisis permitió incluso relacionar una elevada expresión de HDAC2 con un acortamiento del tiempo libre de enfermedad, por lo que se postuló como un posible marcador de esta patología²⁴². Otro estudio reveló la implicación de la SIRT1 ("*NAD-dependent deacetylase sirtuin-1*"), ya que su regulación negativa provoca la sobreexpresión de H2A.Z lo que conlleva a una sobreexpresión de diferentes oncogenes²⁴³. Por otro lado, Kojima *et al.* detectaron mayor expresión de SIRT1 en las líneas celulares independientes de andrógenos PC3 y DU145, respecto de la línea LNCaP que es sensible a ellos, abriendo la posibilidad de que esta tuviera un papel en el crecimiento celular y en la quimiorresistencia²⁴⁴. En hiperplasias benignas y células cancerígenas primarias se han detectado cambios en la localización subcelular de HDAC4, que inicialmente se encuentra en el citoplasma, pero conforme avanza la enfermedad a fases más agresivas e independientes de andrógenos se localiza en el núcleo, por lo que su localización nuclear podría contribuir a un comportamiento más agresivo²⁴⁵.

La acetilación también está implicada en la regulación de la actividad del AR, ya que este recluta proteínas co-reguladoras con actividad HAT y HDAC, lo que provoca: o la acetilación del propio AR con un aumento de su actividad transcripcional además de favorecer su unión del DNA, como sucede cuando KAT2B, KAT5, NCOA1 y EP300 interaccionan con el AR²⁴⁶; o la alteración de los niveles de acetilación de los genes a los que regula, como demostraron los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) donde se detectaron histonas acetiladas alrededor de regiones de unión al AR en genes característicos de respuesta a andrógenos. Esto permite asociar el aumento de la acetilación de histonas con la progresión a la independencia androgénica, ya que según apuntan algunos estudios, la hiperacetilación local y la cromatina abierta contribuyen a reducir la dependencia androgénica en modelos de cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC)²⁴⁷. En este sentido, en modelos de CRPC se ha demostrado un aumento de la expresión de la HAT Tip60, que acetila AR favoreciendo su translocación al núcleo y facilitando la activación del AR de manera independiente de su ligando²⁴⁸.

Las alteraciones que sufren las HMT y las HDM, enzimas encargadas de la metilación de histonas, también resultan de gran importancia en la progresión de esta enfermedad. En cuanto a las HMTs, existen numerosos estudios que demuestran que la sobreexpresión de EZH2, responsable de trimetilar la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3), es un hecho frecuente en tumores de próstata metastásicos y que sus niveles se encuentran también elevados en CRPC. Esto se debe a la fosforilación de EZH2 en la Ser21 lo que provoca que su acción sea la de promover la activación génica actuando como un coactivador transcripcional del AR y otros factores relacionados²⁴⁹. Karanikolas *et al.* demostraron que la sobreexpresión de esta enzima en células de cáncer de próstata aumentaba su capacidad invasiva, mientras que esta disminuía al inhibir su expresión principalmente en células independientes de andrógenos²⁵⁰. Además, se sabe que EZH2 regula la progresión del ciclo celular y la proliferación mediante el control de p53 y E2F1 que regula la transición G2/M. Otra HMT relacionada con la progresión del cáncer de próstata es HMT SET8, encargada de metilar la H3K20, que se asocia con la transición epitelio-mesénquima (EMT)²⁵¹.

Otros estudios se han centrado en el papel de las HDMs, como sucede con LSD1 (KDM1A) que puede actuar como un co-represor transcripcional cuando demetila a la lisina 4 de la histona H3 (H3K4), o como un activador al demetilar a la lisina 9 de la histona H3 (H3K9). La afinidad por un residuo u otro varía dependiendo del estado de fosforilación de la histona H3, el cual está regulado en parte por el AR

mediante el control de las quinasas que fosforilan los residuos. De tal manera, la fosforilación de la treonina 11 de esta histona (H3T11p) aumenta la afinidad de LSD1 por H3K9me_{1,2}, mientras que la fosforilación de H3S6 inhibe la capacidad de LSD1 por metilar H3K4me_{1,2}²⁵².

Otra demetilasa implicada en la progresión del cáncer de próstata es KDM4C (JMJD2C), que elimina la trimetilación de residuos de lisina (H3K9me₃ y H3K27me₃). Se ha demostrado que esta enzima interacciona *in vitro* e *in vivo* con el AR y forma el complejo KDM4C-AR-LSD1, capaz de eliminar la trimetilación de la H3K9 activando así la transcripción de genes diana del AR. Diferentes estudios han demostrado que esta HDM se expresa más en cáncer de próstata resistente a andrógenos que en tumores sensibles e hiperplasias prostáticas, por lo que se postula como una interesante diana terapéutica en la progresión del cáncer de próstata²⁵³.

Todas estas enzimas se encargan de mantener los niveles de metilación y acetilación en un equilibrio sostenible y su estudio resulta de gran interés. Algunos estudios han demostrado que la sobreexpresión de HDAC2, LSD1 y EZH2 son marcadores independientes de la recurrencia en el cáncer de próstata^{216,254}.

Por último, la fosforilación de histonas y las enzimas que se encargan de ella también son relevantes en el desarrollo y progresión del cáncer de próstata. Se han detectado fosforilaciones en residuos de serina, treonina y tirosina, siendo estas últimas las menos conocidas. Aunque recientemente se ha publicado un estudio sobre el papel de la fosforilación de la tirosina 88 de la histona H4 en el CRPC. Este estudio muestra la importancia de la fosforilación de H4Y88 por parte de la quinasas ACK1, lo que provoca un aumento de la transcripción del AR debido a la formación de un complejo (WDR5/MLL2) con actividad HMT que metila la H3K4 favoreciendo la transcripción²⁵⁵.

Aunque si se conocen algunas de las enzimas encargadas de la fosforilación de histonas, no sabemos mucho sobre las proteínas que revierten este proceso, esto sumado a que todas las marcas epigenéticas cooperan entre sí, nos hace preguntarnos cual puede ser el papel de la fosfatasa SHP-1 en la progresión del cáncer de próstata desde un punto de vista epigenético.

Objetivos

El cáncer es una enfermedad en la que convergen factores ambientales, genéticos y epigenéticos que afectan a importantes funciones celulares encargadas del mantenimiento de la homeostasis celular. Datos previos de nuestro grupo indican que la tirosina fosfatasa SHP-1 regula vías de transducción de señales implicadas en la regulación de la proliferación, adhesión y migración celular. Esta regulación la realiza, al menos en parte, mediante el control de la expresión génica. Además, hemos demostrado la presencia de SHP-1 en el núcleo, lo que nos hizo plantearnos que SHP-1 podría estar regulando la expresión génica mediante el control de las modificaciones epigenéticas.

El objetivo principal de este proyecto fue, por tanto, estudiar el papel de SHP-1 en la regulación de la expresión génica mediante el control de las modificaciones epigenéticas en las líneas celulares de cáncer de próstata, identificar los genes que se vean afectados por estos cambios y dilucidar los mecanismos por los que podría estar produciéndose este control. Los objetivos concretos que nos hemos propuesto son:

1. Determinar si SHP-1 regula la expresión génica mediante cambios en la metilación del DNA
2. Seleccionar genes, con importantes funciones en el desarrollo tumoral, cuya expresión esté regulada por SHP-1.
3. Estudiar si los cambios de expresión de los genes seleccionados en el objetivo anterior también se asocian a cambios en las modificaciones de histonas de su región promotora.
4. Desentrañar los mecanismos moleculares por los que SHP-1 podría estar regulando las modificaciones epigenéticas y por tanto la expresión génica.
5. Analizar las consecuencias de la anulación de la expresión SHP-1 en el desarrollo y la progresión del cáncer de próstata.

Materiales y Métodos

1. Cultivo celular

Las líneas celulares utilizadas fueron PC3 y LNCaP, ambas líneas procedentes de tumores prostáticos humanos. Las células fueron obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC). La línea celular PC3 procede de una metástasis ósea de adenocarcinoma de próstata de grado IV. Son células de morfología epitelial de cariotipo alterado, poseen 62 cromosomas y cierto grado de inestabilidad citogenética. No expresan PSA, carecen de receptor de andrógenos (AR), por lo que son células independientes de ellos. Son capaces de producir tumores xenógrafos indiferenciados de alta capacidad invasiva y metastatizante²⁵⁶. Clínicamente representan *in vitro* la etapa independiente de andrógenos del cáncer de próstata. Por otro lado, se utilizó la línea celular LNCaP procedente de metástasis en ganglio linfático. Estas células, expresan PSA y presentan receptor de andrógenos (AR), por lo que son sensibles a esta hormona, clínicamente representan *in vitro* la etapa dependiente de andrógenos²⁵⁷.

Las líneas celulares de cáncer de próstata PC-3 y LNCaP fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (FBS), 50 U/ml de penicilina/estreptomicina y 0,5 µg/ml anfotericina B en condiciones de esterilidad en un incubador a 37° C en atmósfera húmeda y un 5% de CO₂. El medio se cambió cada 2-3 días hasta alcanzar una confluencia del 90%, cuando las células se despegaron del soporte utilizando tripsina 0,05% - EDTA 0,02% en PBS. La tripsina se neutralizó con medio completo y las células se sembraron en nuevos frascos de cultivo.

Las células se trataron con diferentes compuestos químicos que se especifican en la tabla 3.1 al igual que las concentraciones finales a las que se usaron.

Tabla 3.1: Compuestos químicos con los que se ha tratado a las células.

Compuesto	Concentración de uso	Casa comercial
5-aza-2-deoxicitidina (5- Aza)	2 y 5 µM	Sigma-Aldrich
Dihidrotestosterona (DHT)	10 ⁻¹¹ - 10 ⁻⁷ M	<i>Sigma-Aldrich</i>
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	10 ⁻⁸ M	<i>Sigma-Aldrich</i>
N-phenyl-n-hydroxtoctanediamide (SAHA)	5 µM	<i>Galchimia</i>

2. Transfección de RNA de interferencia

Se sembró la cantidad de células estimada dependiendo el tamaño de la placa. En el caso de las células PC3 se sembraron 24 horas antes, mientras que las LNCaP se sembraron con 48 horas de antelación, ya que estas células necesitan más tiempo para adherirse al soporte. Las placas se transfectaron con RNA pequeño de interferencia (siRNA) específico para el gen de SHP-1 (*ptpn6*), usando como agente de transfección la *Oligofectamina* (Invitrogen), o *Lipofectamine RNAiMAX* (Invitrogen). Como control, se transfectaron células con un RNA *scrambled* (SC) que no inhibe ningún gen humano. Para ello, se diluyó el RNA en medio *Optimen* (*Gibco*) sin suero ni antibióticos, y por otro lado se diluyó el agente de transfección en *Optimen*. Posteriormente se mezclaron ambas soluciones y se dejaron incubando 15 minutos en el caso de lo *Oligofectamine* y 5 minutos en el caso de la *Lipofectamine RNAiMAX*, a temperatura ambiente. En este tiempo se reemplazó el medio de las células por *Optimen* y se añadió la mezcla anterior, incubándola durante 6 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se suplementaron las células hasta dejarlas a 10% de suero sin antibióticos y se incubaron 48 horas más. Se analizó la inhibición 72 horas post-transfección.

Las transfecciones se han llevado a cabo en diferentes tamaños de soporte celular y las cantidades tanto de células como de reactivos fueron ajustadas para cada uno de los tamaños.

3. Transfección estable de SHP-1 con partículas lentivirales

Para la producción de líneas celulares de cáncer de próstata con una inhibición estable de los niveles de SHP-1, se utilizaron partículas lentivirales. Estas partículas lentivirales contienen un siRNA contra SHP-1, además de un gen que les confiere resistencia a puromicina, lo que va a permitir seleccionar solamente aquellas células que contengan las partículas lentivirales. Se utilizaron cuatro tipos de partículas lentivirales diferentes dirigidas a distintas zonas de la región codificante del gen *ptpn6*. Las partículas lentivirales utilizadas fueron *MISSION Lentiviral Transduction Particles (SHVRS)* (*Clone ID: (A) TRCN0000006885, (B) TRCN0000006886, (C) TRCN0000006887 y (D) TRCN0000006888*) (Sigma-Aldrich). Para la transfección se sembraron células LNCaP y PC3 en placas p24 a una densidad de 25.000 células/pocillo 24 horas antes. Las condiciones de transfección se fijaron de acuerdo con la casa comercial, teniendo en cuenta las condiciones adecuadas de multiplicidades de infección (MOI), establecidas en una titulación previa. En nuestro

caso las condiciones adecuadas fueron 4 MOI en medio RPMI completo con 8 µg/ml de bromuro de hexadimetrina. Pasadas 24 horas, se cambió el medio de las células manteniéndolas en RPMI 10% FBS durante 48 horas. A continuación, se sustituyó el medio por RPMI 10% FBS con 3 µg/ml de puromicina como agente de selección, esta concentración se determinó mediante una titulación en células LNCaP y PC3 (datos no mostrados). Una vez crecieron las células se procedió a identificar aquellas en las que se había inhibido de manera estable la expresión de SHP-1 mediante *Western blot*.

4. Inmunofluorescencia

La localización subcelular de SHP-1, se determinó utilizando anticuerpos específicos contra esta proteína junto con anticuerpo secundario conjugado fluorescente. Para ello, las células se fijaron con paraformaldehído 4% en PBS 1x durante 15 minutos. Seguidamente, se lavaron con PBS 1x y se permeabilizaron con Tritón-X-100 al 0,1% en PBS 1x durante 10 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar nuevamente con PBS 1x, se bloqueó con BSA al 1% en PBS 1x durante 1 hora a 37 °C. A continuación, se incubaron las células con el anticuerpo primario en solución de bloqueo (1:100) durante toda la noche a 4 °C o 1 hora a 37 °C. Para detectar el anticuerpo unido se incubó con un anticuerpo secundario (anti-ratón o anti-conejo según corresponda), que se encuentra conjugado con un fluoróforo AlexaTM488 o AlexaTM633 (1:2000) también diluido en solución de bloqueo. La solución de montaje (*Invitrogen*) que se utilizó contiene DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindo) que tiñe los núcleos. Tras 24 horas, se analizaron las muestras utilizando un microscopio confocal *Leica TCS-SL*.

5. Extracción de DNA de líneas celulares

Para la extracción de DNA se resuspendieron las células en tampón de proteinasa K (1 M Tris pH 8,1; NaCl 2,5 M; EDTA 0,5 M; 1% SDS) con 0,1 mg/ml de proteinasa K (*Roche*) y se incubaron toda la noche a 37° C. Posteriormente, se añadió 1,5 M NaCl y tras darle vortex se centrifugó a 13.000 rpm 15 minutos. Tras recoger el sobrenadante, se añadió un volumen de isopropanol al 100% para precipitar el DNA y se centrifugó a 13.000 rpm 5 minutos. A continuación, el precipitado obtenido se lavó con etanol al 70% y se dejó secar. Una vez seco se resuspendió en agua miliQ estéril y se cuantificó con un espectrofotómetro (*Nanodrop* de *Thermo Scientific*). Las muestras de DNA se guardaron a -20 °C hasta su uso.

6. Análisis de la metilación del DNA

6.1. Modificación del DNA con bisulfito sódico

El tratamiento con bisulfito sódico se basa en su capacidad de convertir las citosinas no metiladas en timinas, mientras que las citosinas metiladas son resistentes a la reacción por lo que permanecen sin cambios. Esto nos permite discriminar entre secuencias metiladas y no metiladas (figura 3.1).

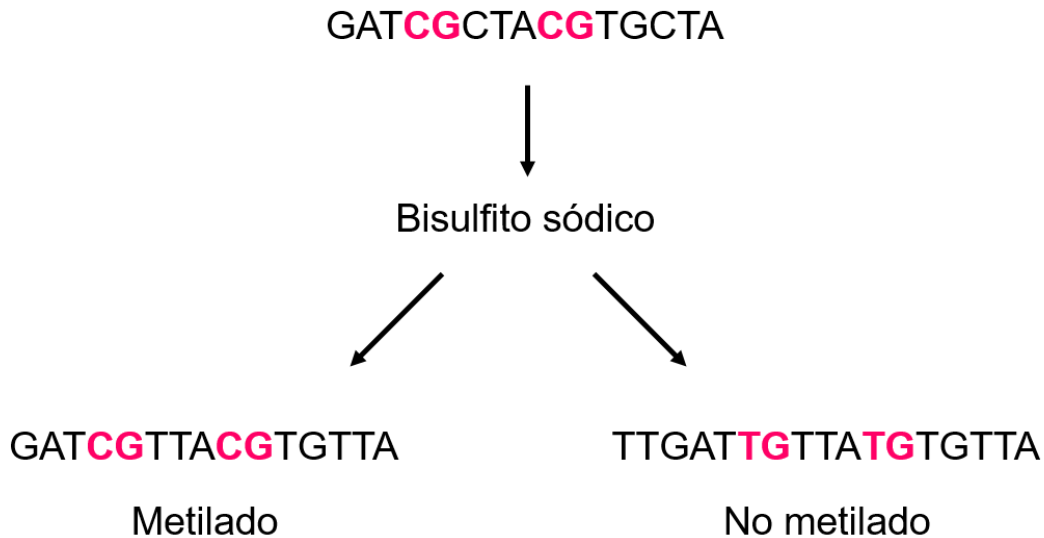


Figura 3.1. Esquema de la modificación del DNA con bisulfito sódico.

Para la modificación del DNA se usó el *kit EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research)* utilizando el protocolo de modificación indicado por el fabricante. La preparación de las muestras, reactivos, y protocolo de purificación se hizo tal como recomienda la casa comercial. La reacción de conversión se llevó a cabo en el termociclador dejando las muestras a 98 °C durante 10 minutos e incubándolas después a 64 °C durante 2 horas y media. Finalmente, se purificó el DNA utilizando las columnas y los *buffers* de dicho *kit*. El DNA convertido se eluyó en 20 µl de agua y se mantuvo a -20 °C hasta su uso.

6.2 Plataformas de análisis epigenómico

Para analizar el estado de la metilación global en nuestras líneas celulares cuando se inhibe la expresión de SHP-1, se utilizaron dos *arrays* de metilación de *Illumina, Inc* (San Diego, USA) el *GoldenGate Methylation Cancer Panel I (GoldenGate)* y el *Infinium HumanMethylation450k BeadChip (Infinium 450k)*.

6.2.1. *GoldenGate Methylation Cancer Panel I*

La plataforma *GoldenGate* permite comparar el estado de metilación de 1.505 CpGs localizadas en regiones promotoras, de las cuales 1.044 CpGs se encuentran localizadas en islas CpGs y 461 no pertenecen a ellas. Las CGs estudiadas corresponden con 807 genes, dentro de los cuales 231 genes contienen una sola CpG por gen para ser estudiada, 463 genes poseen dos sitios CpG y 114 genes presentan de tres a más sitios CpG incluidos dentro del estudio. Entre los genes estudiados en este *array* encontramos genes supresores de tumores, oncogenes, genes implicados en procesos celulares relacionados con el desarrollo del cáncer como la reparación del DNA, control de ciclo celular, apoptosis, diferenciación, ligados al cromosoma X e imprinting. Mediante el diseño de sondas específicas, este ensayo nos permite diferenciar entre secuencias metiladas y no metiladas. Para una mayor especificidad, se usan sondas alelo-específicas y *locus*-específicas que permiten cuantificar como se encuentra el estado de metilación de la CpG de interés, a través del valor β , que relaciona la fluorescencia emitida por cada uno de los alelos, metilado (M) y no metilado (U).

$$\beta = \text{Max} (M, 0) / [\text{Max} (M, 0) + U (M, 0) + 100]$$

El valor β nos permite cuantificar, de una manera relativa, los niveles de metilación de CpGs específicos en un rango entre 0 y 1, siendo 0 un estado completamente no metilado y 1 completamente metilado.

6.2.2. *Infinium HumanMethylation450K BeadChip*

La forma de llevarse a cabo el *array Infinium450K* es diferente respecto al *GoldenGate*, lo que ha permitido un aumento de la resolución, además de un incremento en el número de CpGs estudiadas. El *array Infinium450K* nos posibilita estudiar 450.000 CpGs localizadas en todo el genoma, ya que se encuentran distribuidos en el promotor, extremo 5' UTR, primer exón, cuerpo de los genes y el extremo 3' UTR. Esta tecnología cubre el 96% de las islas CpGs del genoma (incluso islas fuera de regiones codificantes), las orillas de estas islas (*CpG Shore*), las regiones que las flaquean y CpGs aislados. Además, se encuentran representados un 99% de los genes anotados en la base de datos *NCBI Reference Sequence (RefSeq)*. Esta técnica ha sido validada por dos laboratorios independientes ^{258, 259}.

El *GoldenGate* centra el estudio en la región promotora, tomándose como referencia para su clasificación el gen más cercano a la isla CpG, mientras que, en

este *array*, como ya mencionamos anteriormente, el área de estudio es mucho más amplia. Respecto a las islas CpG los *loci* estudiados se agrupan en función de la distancia a la misma, denominándose *Island* a las que se encuentran en el interior de la isla, *Shore* aquellas que están a menos de 2.000 pb de una isla y *Shelf* a las que se localizan a más de 2.000 pb de cualquier isla. Las CpGs se agrupan, además, respecto a la zona del gen en la que se encuentran, en este caso se habla del promotor (TSS1500/TSS200/5' UTR/ 1^{er} Exón) si se localiza en una región entre 1.500 pb *upstream* y el primer exón, del cuerpo del gen o *body gene* y de las regiones intergénicas (figura 3.2).



Figura 3.2. Distribución de las sondas por el genoma. (A) Regiones del gen. (B) Regiones de las islas CpG.

El ensayo se llevó a cabo con 500 ng de DNA a una concentración de 100 ng/ μ l. Este DNA previamente fue sometido a un control de calidad para evaluar tanto la integridad como la cantidad de DNA de doble cadena contenida en la muestra. Una vez verificada la buena calidad del DNA, se realizó su conversión e hibridación de acuerdo con los protocolos y las recomendaciones sugeridas por *Illumina (Infinium HD Assay, Methylation Protocol Guide)*.

El estado de metilación para un sitio CpG se determina mediante el valor beta (β), un ratio que compara la señal de fluorescencia del *locus* metilado con la suma de las señales del *locus* metilado y del no metilado. Su valor oscila entre 0 (totalmente no metilado) y 1 (totalmente metilado).

Los datos crudos de intensidad de fluorescencia fueron normalizados empleando el programa *Genome Studio (V21010.3, Illumina)*, empleando normalización por controles e incluyendo el filtro corrector de señales de fondo. Las intensidades normalizadas se emplearon para calcular los valores de metilación del DNA (valores beta, β -value).

6.3 Secuenciación genómica del DNA modificado

Esta técnica nos permite obtener información acerca del estado de metilación de todas las citosinas comprendidas en la secuencia amplificada por los oligos²⁶⁰. Estos

oligos no deben contener dinucleótidos CpG, por lo que amplificarán la secuencia de interés independientemente de su estado de metilación.

Primeramente, se extrajo DNA genómico de las líneas celulares y se procedió a su modificación con bisulfito sódico. Seguidamente, se realizó una PCR del DNA modificado con *primers* específicos a 0,2 μ M; tampón 10X; $MgCl_2$ a 1,5 mM; dNTP a 0,2 mM y 1,5 U de Taq polimerasa (IMMOLASE™ DNA-polimerasa *Bioline, MA*). Los *primers* se diseñaron con el programa *Methyl Primer Express* (Applied Biosystem), asegurándonos que la secuencia que se va a amplificar contenga la CG estudiada en el *array*. Las secuencias de los oligos utilizados se encuentran detallados en la tabla 3.2. Las condiciones de PCR empleadas fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización (10 minutos a 95 °C), seguidos de 40 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales constó de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a la temperatura específica de anillamiento de los *primers* y 30 segundos a 72 °C, transcurridos los ciclos las muestras estuvieron 7 minutos a 72 °C y posteriormente se mantuvieron a 4 °C.

Tabla 3.2: Oligos diseñados con el *Methyl Primer Express*.

<i>Gen</i>	Primer sentido	Primer antisentido
<i>CEBPD</i>	GTGGGTTGGGGGTTTTTA	CTAACTCRCTAAAACCCCT
<i>GSTP1</i>	ATTTGGGAAAGAGGGAAAGGTT	TAACCCCATACTAAAACTCTAAAC
<i>Hin-1</i>	YGTAGTAGGAAGTTGGTTAGGG	AAAAAACCTAAAATCCACRATC
<i>KIT</i>	TAATAGGTTTGGAGGGGAATG	CACCTTTCACCCCTAAAATAT
<i>RunX1T1</i>	TTTTTGATAAGTTTTAATGTGTGTTT	AAATAAATACCTCCTCCTCACC

Los productos de la PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% (agarosa de Conda en TAE 1X), usando bromuro de etidio como agente intercalante, y la banda correspondiente al producto específico de PCR se purificó con el kit *Ilustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

A continuación, se clonaron los fragmentos amplificados en el vector pGEM-TEasy (*Promega*) (figura 3.3). Para ello se utilizaron 5 μ l de Rapid Ligation Buffer 2X, 1 μ l de DNA ligasa T4, 1 μ l del vector pGEM-T (50 ng/ μ l) y el producto de PCR también llamado inserto. La ligación se llevó a cabo durante toda la noche a 4 °C. Para calcular las cantidades relativas de vector e inserto se utilizó la fórmula:

$$\frac{\text{ng vector} \times \text{kb inserto}}{\text{Kb vector}} \times \frac{3}{1} = \text{concentración inserto}$$

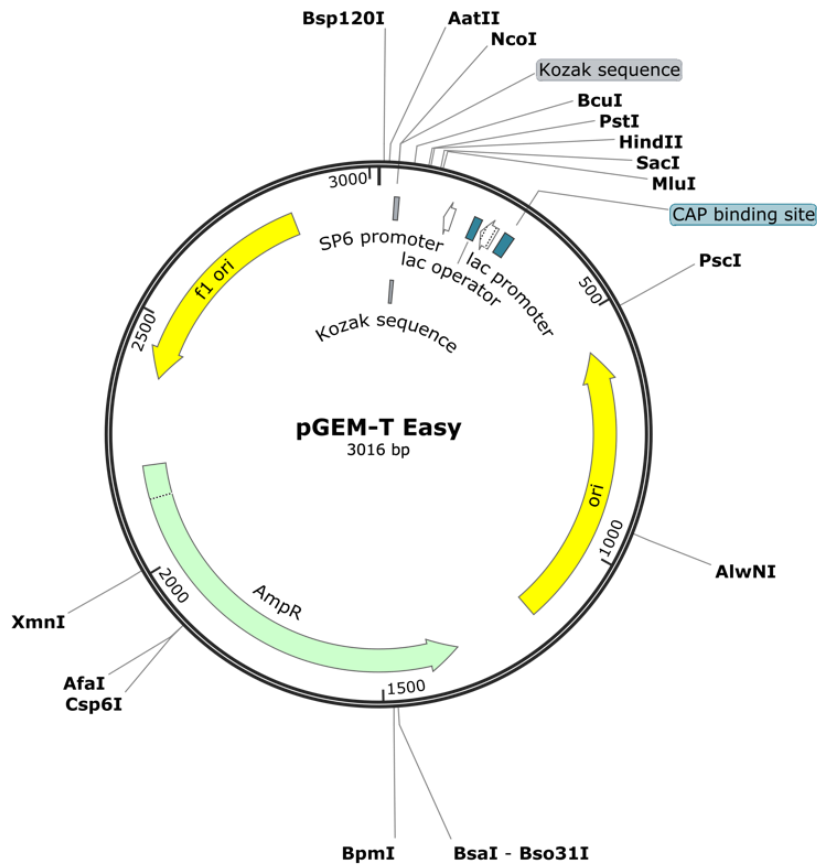


Figura 3.3. Mapa del vector pGEM-TEasy (Promega).

Este vector ligado se transformó en bacterias competentes DH5 α , obtenidas tras un proceso en el que se pone a dichas bacterias en contacto con CaCl₂ (cloruro cálcico) a 0,1 M frío, lo que provoca poros en las bacterias por donde puede introducirse el vector. La transformación se realizó poniendo en contacto las bacterias con el vector durante 20 minutos en hielo. Después se sometieron a un choque térmico incubándolas a 42 °C durante 1 minuto y en hielo 2 minutos. Seguidamente, se añadieron 800 μ l de medio LB (medio Luria-Bertani) y se dejó en agitación a 37 °C durante 1 hora. A continuación, se sembraron las bacterias en placas de LB-agar con ampicilina (50 μ g/ml), en presencia de IPTG 1M y X-Gal; dado que el inserto se introduce interrumpiendo la secuencia del gen LacZ, las colonias que carezcan del inserto tendrán color azul, mientras que las colonias que lo posean serán de color blanco. Esto nos permite distinguir y seleccionar fácilmente las colonias que presentan el vector con el inserto. La ampicilina se utiliza como agente de selección dado que el

vector presenta resistencia a esta. El IPTG induce la expresión de LacZ y X-Gal es un sustrato de LacZ y es el que proporciona el color azul al degradarse cuando LacZ está presente. Las bacterias se crecieron a 37 °C durante toda la noche.

Una vez que tuvimos colonias se seleccionaron 10 positivas, colonias blancas, para cada gen y condición, y se pusieron a crecer en medio LB con ampicilina (50 µg/ml) a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente se extrajo el DNA utilizando *el kit* de miniprep *QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)* siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se realizó una secuenciación del DNA plasmídico extraído para determinar los estados de metilación de los distintos promotores de los genes de interés. La secuenciación automática se llevó a cabo utilizando el oligo T7 en la Unidad de Biología Molecular. Las secuencias obtenidas se analizaron por anillamiento múltiple utilizando el software *BioEdit Sequence Alignment Editor*.

7. Análisis de expresión génica

7.1. Extracción de RNA

La extracción de RNA se realizó usando TRIZOL, siguiendo el protocolo de Invitrogen. Se homogenizaron las células con 1 ml de TRIZOL y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 200 µl de cloroformo por ml de TRIZOL usado, se agitaron y se incubaron 2-3 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se centrifugaron a 12.000 xg 15 minutos a 4°C obteniendo tres fases, de las que se extrajo la fase acuosa, donde se encuentra el RNA. Este se precipitó con 500 µl de isopropanol 100% por ml de TRIZOL. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 12.000 xg 10 minutos a 4 °C. Seguidamente, se eliminó el sobrenadante, se lavó el *pellet* con etanol 75% y se centrifugó a 7.500 xg 5 minutos a 4 °C eliminando el sobrenadante y dejando secar el *pellet*. Finalmente, se resuspendió el *pellet* en agua libre de RNasa (DEPC) y se incubó durante 10 minutos a 55 - 60 °C. Tras cuantificarse el RNA en el *Nanodrop* se guardó a -80 °C.

7.2. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA, a partir de 4 µg de RNA total, se realizó con el *kit* de *SuperScript III* de Invitrogen de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Este proceso consistió en una desnaturalización del RNA, en presencia de 1 µl de oligo dT (20mM) y 1µl de dNTPs (10 mM) a 65 °C durante 5 minutos. A continuación, se llevó a cabo la síntesis del cDNA con un mix de 4µl de tampón 5x *First-strand*, 1µl de DTT

(0,1 M), 1 µl de RNasa *out* (40 U/µl) y 1 µl de transcriptasa inversa (*SuperScript III*), la mezcla se incubó a 50 °C durante 60 min. La enzima se inactivó dejando la mezcla a 70 °C durante 15 min.

7.3. Cuantificación de la expresión génica por PCR a tiempo real

La PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) permite determinar la cantidad de cDNA o DNA (qChIP) de una muestra mediante una cuantificación relativa. Para realizar esta técnica se empleó un termociclador ABI 7500 Fast. Los oligos usados para la reacción fueron adquiridos en Sigma-Aldrich e Invitrogen y sus secuencias se encuentran especificadas en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Secuencias de los oligos usados en el estudio de la expresión en qRT-PCR.

Gen	Oligo sentido 5' → 3'	Oligo antisentido 5' → 3'
CDC7AL	GGTAACACGTGCCATCAGTG	TCTGACATCCTCCCCATAGC
CDKN1A	GACACCACTGGAGGGTGACT	CAGGTCCACATGGTCTTCTCT
CEBPD	ATCGACTTCAGCGCCTACAT	CGCCTTGTGATTGCTGTTGA
DDR2	CCACTATGCAGAGGCTGACA	CAGAGATGAACCTCCCCAAA
FHL-1	TGGCACAAAGACTGCTTCAC	CTTGTGCACTTCACGCAAT
FMR1	GTGGGAACAAAGGACAGCAT	AGCTCCAATCTGTGCGAACT
GAPDH	TCCACTGGCGTCTTCACC	GGCAGAGATGATGACCCTTTT
GNG7	AAGCTGGTGGAACAGCTACG	TTGTCCCTTAAAGGGTTCTCC
GSTP1	GGCAACTGAAGCCTTTTGAG	GGCTAGGACCTCATGGATCA
Hin-1	TCCGCTGCTGCTTTCTTAGT	GCCCTCTATGAGGTGGTTCA
IGFBP3	ACAGCCAGCGCTACAAAGTT	CTGGGACTCAGCACATTGAG
KIT	TGACTTACGACAGGCTCGTG	CCACTGGCAGTACAGAAGCA
MET	ACGGTCCAAAGGGAAACTCT	CTCCAGAGGCATTTCCATGT
NEFL	ACCCGACTCAGTTTCACCAG	TCAGCCTTAGACGCCTCAAT
NPY	GGACATGGCCAGATACTACTCG	GGTCTTCAAGCCGAGTTCTG
PTCH2	GAAGCTGGTGGACAGAGAGG	GGGTAGAAGTTGGCCTGTGA
PTGS2	TGAGCATCTACGGTTTGCTG	TGCTTGTCTGGAACAACTGC
RARA	GTGTCACCGGGACAAGAACT	CGTCAGCGTGTAGCTCTCAG
RARB	GGTTTCACTGGCTTGACCAT	AAGGCCGTCTGAGAAAGTCA
RunX1t1	AATGGCCTTCTTCTCTCTTCTC	ATGTCATTGCCAAACTGCTG
SHP-1	TTTCAAGAAGACGGGGATTG	CGGACTCCTGCTTCTTGTTTC
TBX1	GTGTGAGCGTGCAGCTAGAG	CGAAGTCCATGAGCAGCATA
TNFSF8	ACGAGCCGCAGCTATTTCTA	GGGACGTTGTCAGGTGAGTT

Las reacciones de cuantificación por PCR a tiempo real se realizaron en un volumen final de 10 µl. Cada mezcla de reacción contenía 2 µl de cDNA, 5 µl de 2x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem) y 500 nM de cada uno de los

primers. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación, cada uno de ellos a 95 °C durante 30 segundos y 60 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado en cada uno de los experimentos. Los valores obtenidos se normalizaron utilizando el gen de expresión constitutiva gliceraldehído – 3-fosfato deshidrogenasas (*Gapdh*). El análisis de datos se realizó con el programa 7500 software v2.0.1.

8. Análisis de enriquecimiento de marcas específicas de histonas

8.1. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

La inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) es una técnica que permite estudiar interacciones entre el DNA y las proteínas. Para ello, se fijaron las uniones proteínas-DNA añadiendo formaldehído sobre las células a una concentración final del 1% incubándose durante 15 minutos a temperatura ambiente en agitación. Transcurrido este tiempo, se añadió glicina 0,125 M que se incubó 5 minutos en las mismas condiciones para detener el entrecruzamiento y por último las células se lavaron con PBS 1x con inhibidores de proteasas.

Las células se levantaron de su soporte, mediante un rascador, se resuspendieron en *SDS lysis buffer* (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8,1; inhibidores de proteasas), y se incubaron 10 minutos en hielo. Seguidamente se fraccionó la cromatina en fragmentos de unos 500 pb mediante sonicación. Una vez centrifugadas las muestras durante 10 minutos a 13.000 rpm a 4 °C, se cuantificó la cromatina contenida en el sobrenadante en el *Nanodrop*. Las concentraciones obtenidas se ajustaron para tener una concentración entre 0,7-1 mg/ml y se diluyeron 10 veces en *ChIP dilution buffer* (0,01% SDS; 1,1% Triton-X-100; 1,2 mM EDTA; 16,7 mM Tris-HCl pH 8,1; 167 mM NaCl; inhibidores de proteasas).

A continuación, las muestras se pre-aclararon con *Dynabeads Proteína G (Life Technology)* durante 1 hora a 4°C. A su vez, los *Dynabeads* se incubaron a temperatura ambiente con 5 µg de cada anticuerpo (anti-AcH3, *Milipore*; anti-H3 *Abcam*) creándose el complejo *Dynabeads* proteína G-anticuerpo específico con el que se incubaron posteriormente 2 ml de muestra durante toda la noche a 4 °C en rotación.

Al día siguiente, los complejos formados de *Dynabeads* proteína G-anticuerpo-cromatina se lavaron 3 veces con 1 ml de cada tampón durante 5 minutos en rotación

a temperatura ambiente: tampón *Low Salt Immune Complex* (0,1% SDS; 1% Tritón-X-100; 2 mM EDTA; 20 mM Tris-HCl, pH 8,1; 150 mM NaCl), tampón *High Salt Immune Complex* (0,1% SDS; 1% Tritón-X-100; 2 mM EDTA; 20mM Tris-HCl, pH 8,1; 500 mM NaCl), *LiCl Immune Complex* (0,25 M LiCl; 1% NP-40;1% deoxicolato; 1mM EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 8,1) y TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8). Seguidamente, el complejo cromatina-anticuerpo se eluyó con 250 µl de *Elution buffer* (1% SDS y 0,1 M NaHCO₃) durante 15 minutos a temperatura ambiente, recogiendo el sobrenadante y repitiéndose el proceso una vez más. A continuación, las muestras se desentrecruzaron añadiendo 0,2 M NaCl e incubándolas 4 horas a 65 °C. Pasado este tiempo, se añadieron 10 µl 0,5 M EDTA, 20 µl 1M Tris-HCl pH 6,5 y 2 µl 10mg/ml proteinasa K y se incubaron durante 1 hora a 45 °C para degradar las proteínas. Para recuperar el DNA se añadieron 500 µl de fenol-cloroformo, se centrifugó durante 1 minuto a 13.000 rpm, se recogió la fase acuosa y se repitió el proceso con cloroformo-isoamílico. A continuación, se añadieron 50 µl de 3 M acetato sódico, 1 ml de etanol absoluto y 1 µl de glucógeno (10 mg/ml) y se dejó precipitando toda la noche a -20 °C.

Al día siguiente, las muestras se centrifugaron 15 minutos a 4 °C a 13.000 rpm, se quitó el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol al 70%, se volvió a centrifugar y se eliminó el sobrenadante dejando secar el *pellet*. Una vez seco, se resuspendió el DNA en agua miliQ y se midió la concentración de DNA en el *NanoDrop*.

Los niveles de acetilación de las histonas de la región promotora de los genes se determinaron mediante una qRT-PCR, en este caso denominada qChIP. Para ello se emplearon *primers* que amplifican el promotor de los genes seleccionados (Tabla 3.4). Los valores obtenidos se normalizaron utilizando como control interno el *Input* que se corresponde con la cromatina de partida. El análisis de datos se realizó con el programa 7500 software v2.0.1.

Tabla 3.4. Secuencias de los primers usados en el qChIP

Gen	Oligo sentido 5' → 3'	Oligo antisentido 5' → 3'
CEBPD	ATTTCACTCCCAACCCCGAG	AATGACACTCCCTCTGCCAG
GSTP1	GGCCACAGCGTGAGACTAC	GCCGCTTAGAGGAAAGGAAA
KIT	GGGTGGAAAGGTGGAGAGAG	TTTCGACGTGTTAATGCCGG
RunX1t1	GGGCCCTGCTGATATTGTAA	CTTGTCAGGATGGCACATTG

9. Análisis de la expresión proteica.

9.1. Obtención de extractos proteicos

Los extractos celulares se obtuvieron añadiendo a las células Tritón X-100 al 1% en tampón base (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1mM EDTA; 1 mM o-

vanadato de sodio; inhibidores de proteinasas comerciales) y dejándolas en rotación a 4 °C durante 30 minutos; a continuación se centrifugaron a 13.200 rpm 20 minutos a 4 °C, tras lo que se recogieron los sobrenadantes y se procedió a la cuantificación de proteínas por el método de Bradford. Como estándar se utilizó una solución de albúmina sérica bovina a una concentración conocida (1mg/ml).

9.2. Fraccionamiento subcelular

Se utilizaron las líneas celulares LNCaP y PC3, además de sus correspondientes inhibiciones estables (SC y 1C). Tras el contaje de las células, se resuspendieron en el tampón A (10 mM Tris HCl pH 7,8; 10 mM NaCl; 2mM Cl₂Mg, 10mM β-mercaptoetanol; 1mM o-vanadato e inhibidores de proteasas comerciales) y se incubó 20 minutos a 4 °C. A continuación, se añadió NP-40 al 1% v/v y se incubó a 4 °C durante 10 minutos. Seguidamente, se pasó la muestra por una aguja de 21G cuatro veces y se centrifugó a 400 xg durante 6 minutos. El sobrenadante es la fracción citoplasmática, mientras que el *pellet* es la fracción nuclear. Posteriormente se lavó el *pellet* con PBS 1x con inhibidores de proteasas comerciales y se centrifugó 1 minuto a 500 xg. Después se lisaron los núcleos con tampón C (50 mM HEPES pH 7,9; 100mM NaCl; 10% v/v glicerol, 10mM EDTA, 1% v/v Tritón-X-100 1%; 1mM o-vanadato; inhibidores de proteasas comerciales) incubándolos 30 minutos a 4 °C y se centrifugó a 12.000 xg durante 15 minutos a 4 °C, obteniendo de esta manera la fracción nuclear. Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford utilizando como estándar una solución de albúmina sérica bovina a una concentración conocida (1 mg/ml).

9.3 Extracción ácida de histonas

Para realizar la extracción ácida de histonas primeramente debemos extraer los núcleos celulares. Para ello, una vez se levantaron las células se lavaron con PBS 1x y se centrifugaron a 200 xg durante 5 minutos a 4 °C. Después las células se resuspendieron en tampón RSB (10 mM Tris 7,5; 10 mM NaCl; 3 mM MgCl₂; 0,1% NP40), se incubaron en hielo durante 10 minutos y se centrifugaron a 690 x g durante 5 minutos a 4 °C. Para extraer las histonas presentes en los núcleos, el *pellet* se resuspendió en HCl 0,25M y se incubó 4 horas a 4 °C en rotación. Después se centrifugaron a 16.000 x g durante 5 minutos a 4 °C. Se cogió el sobrenadante y se precipitaron las histonas con 8 volúmenes de acetona incubándolas toda la noche a -20 °C. Al día siguiente se centrifugaron a 16.000 x g durante 5 minutos a 4 °C y se dejó que se evaporasen los restos de acetona. Posteriormente se diluyeron en tampón de carga 1x.

9.4. Inmunodetección de proteínas (*Western Blot*)

Los extractos proteicos obtenidos (30-50 µg de proteína, en función de la proteína que se quiere detectar) se desnaturalizaron a 96 °C durante 5 minutos en tampón de carga (62,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 3% SDS; 4 mM EDTA; 5% glicerol; 1 % β-mercaptoetanol; 0,1% azul de bromofenol) y se cargaron en geles de poliacrilamida-SDS con unas concentraciones que pueden variar del 7,5% al 15% dependiendo de la proteína que se quisiera estudiar. La migración se llevó a cabo a 150 voltios en tampón de migración TGS 1x (BioRad). Tras la electroforesis, se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF (*GE Healthcare*) que previamente había sido activada con metanol. La transferencia se realizó en el caso de histonas aplicando una diferencia de potencial de 60 voltios durante 3 horas en frío en tampón de transferencia TG 1x (BioRad) con un 15% de metanol y 0,02% de SDS. En cambio, para el resto de las proteínas se aplicó una diferencia de potencial de 400 mA durante 75 minutos en frío en tampón de transferencia TG 1x (BioRad) con un 20% de metanol y 0,02% de SDS.

Una vez acabada la transferencia, la membrana se incubó en una solución de bloqueo, tal como leche desnatada en polvo (5%) o albúmina sérica bovina (5%) en tampón TTBS (0,1 mM Tris; 1,5 mM ClNa; 0,05% Tween 20), durante 1 hora a temperatura ambiente, consiguiendo así bloquear los sitios inespecíficos de unión de la membrana. Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo específico de la proteína que se quería detectar. Dicho anticuerpo se diluyó en TTBS más leche en polvo desnatada al 5% o en albúmina sérica bovina al 5% (según el anticuerpo utilizado), y se incubó durante toda la noche a 4 °C o durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras la incubación se lavó la membrana 3 veces durante 5 minutos con TTBS y se incubó durante 1 hora con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (HRP). Tras lavar la membrana 3 veces durante 10 minutos con TTBS, esta se incubó con un reactivo quimioluminiscente (*WesternBright™ ECL, Advansta*), que tiene como sustrato la peroxidasa. Finalmente, los resultados se visualizaron impresionando películas radiográficas de alta sensibilidad especiales para quimioluminiscencia, o empleando *Bio-Rad Chemidoc Imager*.

Tabla 3.5: Anticuerpos utilizados para Western blot.

Anticuerpo	Casa comercial	Peso Molecular (KDa)	Especie
ACH3	Millipore	15	Conejo
Ach4	millipore	11	Conejo
DNMT1	Imagenex	200	Conejo

DNMT3A	Imagenex	102	Conejo
Fosfo-JAK2	abcam	140	Conejo
Fosfo-JAK2	Cell Signaling	140	Conejo
Fosfo-tirosina	SantaCruz		Conejo
GST	Abcam	26	Cabra
H3	Abcam	15	Conejo
H4	Abcam	11	Conejo
HDAC2	Abcam	55	Conejo
HDAC2	Cell Signaling	60	Conejo
HDAC2-ChIP	Abcam	55	Conejo
HDAC4	Abcam	140	Conejo
JAK 2	Cell Signaling	125	Conejo
PARP	BD Transduction	116	Ratón
SHP-1	Santa Cruz	68	Conejo
SHP-1	BD Transduction	68	Raton
SHP-1	Abcam	68	Conejo
SHP-1	Sigma	68	Conejo
β -Tubulina	Sigma	50	Ratón

10. Análisis de interacciones entre proteínas

10.1 Ensayos de *Pull Down*. (Captura y unión)

10.1.1. Transformación de bacterias con el vector de expresión GST

En estos ensayos se utilizaron bacterias competentes de *E.coli* BL21, al ser las más adecuadas para la expresión de proteínas. Estas bacterias fueron transformadas con un vector de expresión que contiene la proteína de fusión GST-SHP1 (pGEX-SHP1), generosamente enviado por el Dr. Frank Böhmer de la Universidad Friedrich Schiller, Alemania, o con el mismo vector pero que expresa solo GST (pGEX) (figura 3.4). Para ello, se mezclaron 50 μ l de bacterias competentes con 6 μ g de vector y se sometieron a un choque térmico que consiste en: 20 minutos a 4 °C (hielo), 1 minuto a 42 °C y 2 minutos a 4 °C. A continuación, se añadieron 850 μ l de medio Luria Bertani (LB) y se incubó en agitación a 37 °C durante 45 minutos. Seguidamente, las muestras se centrifugaron durante 1 minuto a 9.500 x g. El *pellet* obtenido se resuspendió en 70 μ l de medio LB, sembrándose en placas LB ampicilina, que se incubaron durante toda la noche a 37 °C para favorecer el crecimiento de las colonias.

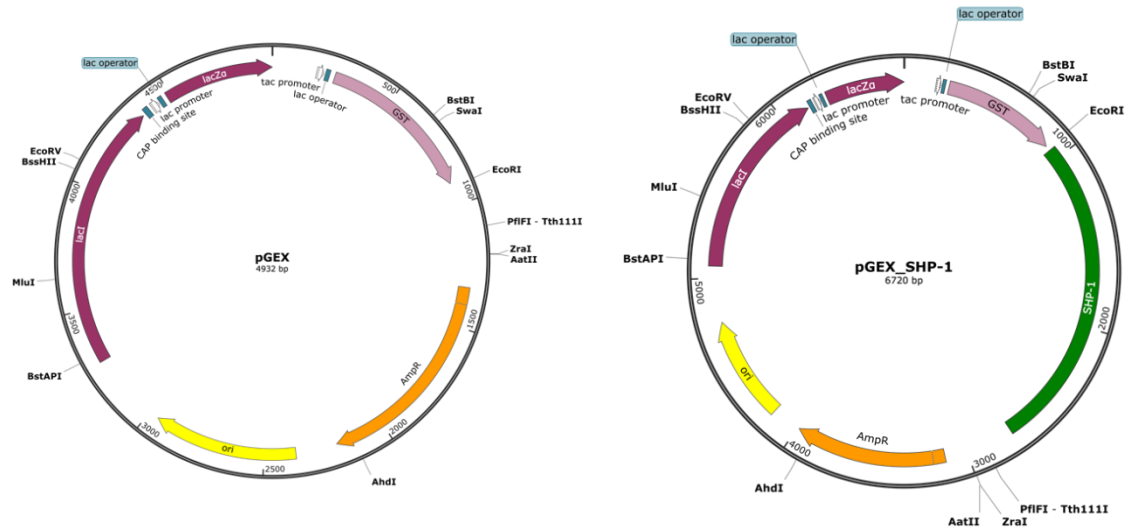


Figura 3.4. Mapa del vector de fusión glutatión S-transferasa. Se muestran los marcos de lectura y las principales características del vector pGEX, que incluye un promotor lac inducible mediante IPTG y un gen de resistencia a ampicilina y el gen que codifica para la glutatión S-transferasa. El vector pGEX_SHP-1 presenta además la secuencia que codifica para la fosfatasa SHP-1.

10.1.2 Expresión de la proteína de fusión GST-SHP-1 en *E. coli*

Para inducir la expresión de la proteína de fusión GST-SHP-1 se siguió el protocolo descrito por el fabricante²⁶¹. Se inoculó una única colonia de *Escherichia coli* (*E. coli*) transformada con el plásmido pGEX en 50 ml de medio LB ampicilina y se cultivó durante toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente se inocularon 7 ml del cultivo a 250 ml de LB con ampicilina y se dejó incubando en las mismas condiciones, hasta que alcanzó una densidad óptica de 0,8 - 1 medida a una longitud de onda de 600 nm. A continuación, se indujo la expresión de la proteína de fusión con isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) a una concentración 0,2 mM durante 16 horas a 25 °C.

10.1.3. Aislamiento y purificación de la proteína de fusión GST-SHP1

Una vez finalizó la inducción el cultivo se centrifugó a 6.000 x g, 10 minutos a 4 °C y se resuspendió el *pellet* bacteriano en 5 ml de tampón A (25 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM EGTA; 1 mM EDTA; 5 mM Glicofosfato; 10 mM β-mercaptoetanol; inhibidores de proteasas comerciales). Se lisaron las bacterias mediante tres ciclos sucesivos de congelación (-80 °C) y descongelación (37 °C). A continuación, se añadieron 2,5 mg de lisozima y se dejó incubar 20 minutos a 25 °C. Después se añadió 20 mM EDTA y 0,5% Tritón X-100 y se incubó 20 minutos a 25 °C. El lisado bacteriano se centrifugó a 50.000 x g durante 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante resultante se incubó con glutatión-Sepharosa 4B durante una hora a 4 °C en rotación. Seguidamente se centrifugó a 1.000 x g durante 5 minutos y se

descartó el sobrenadante, mientras que el precipitado se lavó 4 veces con 5 ml de tampón B (25mM Tris HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 10 mM β -mercaptoetanol; 1% Tritón-X-100), una vez con el tampón C (50 mM Tris HCl pH 8; 150 mM NaCl; 10 mM β -mercaptoetanol) y se centrifugó. Para eluir la proteína de fusión, los complejos formados (Glutathion-Sepharosa-GST-SHP-1) se incubaron durante 30 minutos a 4 °C con tampón de elución (50 mM Tris-HCl pH 8,5; 10 mM de glutatión reducido) y posteriormente se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos a 4 °C para separar el sobrenadante, que es donde se encuentra nuestra proteína de fusión. La concentración de proteína fue determinada mediante el método Bradford, y los eluidos fueron analizados mediante electroforesis en SDS-PAGE al 10% y teñidos con azul de Coomassie.

10.1.4. Ensayos de Pull down

Para determinar las posibles interacciones de SHP-1 con otras proteínas se realizaron ensayos de captura y unión (*pull down*). Para ello se utilizaron proteínas de fusión que contiene GST unido a SHP-1 (GST-SHP-1), usando como soporte para el *pull down* glutatión-Sepharosa 4B (30 μ l), que se lavó 3 veces con tampón base, centrifugándose cada vez a 2.800 rpm durante 1 minuto a 4 °C. Seguidamente, se puso en contacto la glutatión-Sepharosa 4B con la proteína de fusión incubándose 1 hora en rotación a 4 °C. A continuación, se lavó con tampón lavado 3 veces y se puso en contacto el complejo proteína de fusión-glutatión-Sepharosa 4B con el extracto proteico a 4°C en rotación durante toda la noche. Al día siguiente, se recogió el sobrenadante y se lavó 3 veces el complejo de proteínas: proteína de fusión-glutatión-Sepharosa. Finalmente, los complejos fueron separados con tampón de carga 2x (62,5 mM Tris-HC pH 6,8; 3% SDS; 4mM EDTA; 5% glicerol; 1% β -mercaptoetanol y 0,1% azul de bromofenol), se calentaron durante 5 minutos a 95 °C y se procesaron mediante *Western blot*.

10.2. Inmunoprecipitación

Este ensayo se realizó para la detección *in vivo* de interacciones entre proteínas. Para ello se purificó la proteína de interés utilizando un anticuerpo específico para la misma y se precipitó el complejo antígeno-anticuerpo con *Dynabeads* Proteína G (*Life Technology*). Para ello se tomaron 50 μ l de *Dynabeads* Proteína G suspendidos en tampón fosfato salino (PBS pH 7,4; 0,1% Tween-20; 0,02% NaN₃), y se lavaron tres veces con 200 μ l de acetato sódico 0,1 M. Seguidamente, se resuspendieron en 100 μ l de acetato sódico 0,1 M y se añadieron 2 μ g de anticuerpo específico (anticuerpo anti-SHP-1 (*Santa Cruz*); anti-JAK2 (*Cell Signaling*)). En los tubos control no se incluyó

ningún anticuerpo. Todos los tubos se incubaron durante 45 minutos en rotación a temperatura ambiente. Seguidamente, se separaron los *beads* magnéticos del sobrenadante gracias a un soporte imantado descartando el sobrenadante. A su vez, los extractos proteicos se pre-aclararon incubándolos con *Dynabeads* Proteína G en rotación a 4°C durante una hora. Los complejos formados por el anticuerpo unido a los *Dynabeads* se incubaron con 1 mg de extractos proteicos pre-aclarados de las líneas PC3 y LNCaP respectivamente, en rotación a 4°C durante toda la noche. El día siguiente, se separó el sobrenadante de los complejos *Dynabeads*-anticuerpo-proteínas, y los *beads* se lavaron tres veces con 200 µl de tampón lavado (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA). A continuación, se solubilizaron las proteínas inmunoprecipitadas con 30 µl de tampón de carga 2x incubándose 15 minutos a temperatura ambiente y recogiendo las proteínas co-inmunoprecipitadas que se analizaron posteriormente mediante *Western blot*.

11. Ensayos funcionales *in vitro*

11.1. Ensayos de proliferación celular

Se evaluó la proliferación celular mediante ensayos de MTT (Bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-ilo)-2, 5 difeniltetrazol). El MTT es una sal que es transformada por las oxido-reductasas mitocondriales a formazán, un compuesto que absorbe a 595 nm, por lo que la proliferación celular es proporcional a la absorbancia a esta longitud de onda. Para ello, se sembraron 15.000 células LNCaP SC y LNCaP 1C en placas de 24 pocillos en medio completo. Pasadas 48 horas se cambió el medio por un medio al 0% de FBS con antibióticos. Al día siguiente, se trataron las células con DHT a las concentraciones y a los tiempos indicados en cada figura y se analizó la proliferación celular. Para ello, se añadió 0,5 mg/ml de MTT (*Sigma*) y se incubó durante 2 horas y media. Posteriormente, se aspiró el medio cuidadosamente y se añadieron 100 µl de DMSO (*Panreac*) para solubilizar el precipitado de formazán obtenido. Por último, se leyó la absorbancia a 570-630 nm.

11.1.1. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Se analizó el ciclo celular en presencia y ausencia de SHP-1, en células LNCaP con anulación estable de SHP-1. Para ello se sembraron 150.000 células por pocillo en placas p6, pasadas 48 horas, se cambió el medio y en los pocillos que se iban a tratar con DHT o EGF se añadió medio sin suero. Transcurridas 24 horas, las células se trataron con DHT y EGF a las concentraciones y a los tiempos indicados en cada experimento. Seguidamente, las células se lavaron con PBS al 1%, se disociaron con

0,05% tripsina - 0,02%EDTA en PBS durante 5 minutos y se añadió medio completo para anular el efecto de la tripsina. La suspensión se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y las células se resuspendieron en 472 µl de medio completo añadiendo 0,5% NP40 y 63 µg/ml RNasa A, e incubando la mezcla en hielo durante 30 minutos. Finalmente, se añadió 50 µg/ml de yoduro de propidio y las células se evaluaron con un citómetro de flujo modelo *FACScalibu* de *Beckton Dickinson* (Unidad de cultivos, UAH). Para ello se excitó con un láser de argón de 488 nm y la fluorescencia emitida se recogió en FL2 a 585 nm. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software *Cylogic v.1.2.1*.

11.2. Ensayo de adhesión celular

Este tipo de ensayos permite estudiar la capacidad que poseen las células de adherirse al sustrato. Antes del ensayo, las placas de 96 pocillos se recubrieron con fibronectina (2,5 µg/cm²) y se incubaron durante 2 horas a 37 °C sin humedad, seguidamente se lavaron con PBS 1x y se guardaron a 4 °C hasta el momento de usarse. En el momento del ensayo se añadió a cada pocillo 25.000 células y se incubaron a 37 °C durante 15, 30, 60 y 120 minutos. A cada uno de los tiempos indicados se aspiró el medio, se lavó con PBS 1x y se añadieron 100 µl de medio RPMI-1640 más 0,5 mg/ml de MTT (*Sigma*) incubándose a 37 °C durante 3 horas. Posteriormente, se aspiró el medio cuidadosamente y se añadieron 100 µl de DMSO (*Panreac*) para solubilizar el precipitado obtenido. Por último, se leyó la absorbancia a 570-630 nm: la absorbancia obtenida va a ser directamente proporcional al número de células adheridas a la matriz extracelular.

11.3. Ensayo de migración

Este tipo de ensayo permite determinar y comparar la migración celular en distintas condiciones. Los ensayos de migración se realizaron mediante ensayos de migración en cámaras *transwells*.

11.3.1. Ensayo de migración en cámaras *transwells*

Las cámaras *transwells* constan de dos compartimentos, uno superior (inserto) cuya base es una membrana de policarbonato con poros de 8 µm que se recubrió de fibronectina para favorecer la adhesión celular y la activación de los mecanismos responsables de la motilidad celular, y otro inferior donde se añadió medio RPMI al 21% FBS. El día de antes de realizar el ensayo, las cámaras *transwells* se recubrieron

con 2,5 μg de fibronectina por cm^2 (100 μl de fibronectina a una concentración de 0,008 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y se incubaron a 37 °C, sin humedad, durante toda la noche.

Para estos ensayos en la parte superior de los *transwells* se añadieron 200 μl de la suspensión celular que contenía 70.000 células y en la parte inferior se añadieron 600 μl de medio al 21% de FBS como quimioatrayente. Las células se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Pasado este tiempo, las células se fijaron con 10% de ácido tricloroacético (TCA) durante 15 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, se tiñeron con una solución compuesta de 2,5% cristal violeta en 20% metanol durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las células de la cámara superior que no atravesaron la membrana se eliminaron con un hisopo mientras que las células de la cara inferior, que migraron se fotografiaron (al menos 3 campos) para su cuantificación.

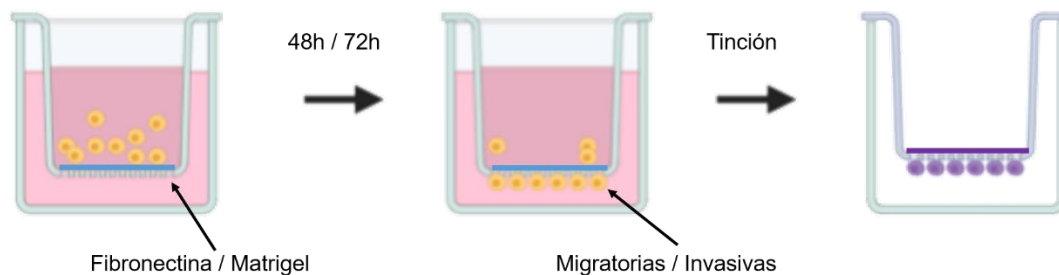


Figura 3.5. Ensayos de migración e invasión. Representación de las cámaras *transwell* tratadas con fibronectina para los ensayos de migración y las cámaras con *matrigel* en el caso de los ensayos de invasión. A las 48h o 72h de incubación las células, en migración o invasión respectivamente, que atravesaron el inserto se tiñeron con cristal violeta, se fotografiaron y se cuantificaron

11.4 Ensayo de invasión celular

Para este tipo de ensayo se utilizaron cámaras *transwell* con la membrana de policarbonato recubierta de una matriz artificial fabricada con componentes similares a los de la matriz extracelular (*Matrigel*, *Fisher Scientific*). Antes del ensayo, las cámaras se atemperaron añadiendo el medio correspondiente libre de suero e incubándolos a 37 °C durante al menos 2 horas antes de añadir las células. En el compartimento superior se añadieron 200 μl de la suspensión celular que contenía 70.000 células y en el inferior se añadieron 600 μl de medio al 21% de suero como factor quimioatrayente. Las células se incubaron a 37 °C durante 72 horas. Transcurrido este tiempo, las células se fijaron del mismo modo que en la migración con *transwell* y se fotografiaron (al menos 3 campos) para su cuantificación.

12. Análisis bioestadístico

Las secuencias de DNA y RNA en formato FASTA se obtuvieron de la página <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>.

Para el procesamiento de los datos se han utilizado los programas *Microsoft Office Excel* y *GraphPadPrism5*. La comparación de medias entre muestras independientes se utilizó el test de *t-Student* (estadística paramétrica).

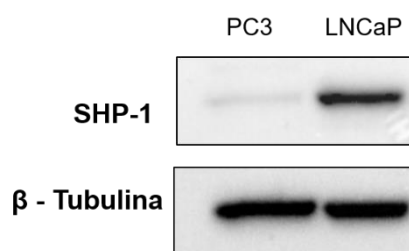
El análisis bioestadístico de los datos del *array* se realizó con el Genome Studio (V21010.3, *Illumina*) y con el programa *Microsoft Office Excel*. Para la determinación de diferencias significativas se utilizaron los *test* de U de Mann-Whitney para variables continuas y el de contingencia Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher para las variables categóricas.

Resultados

Nuestro grupo de investigación fue el primero en demostrar la presencia de la tirosina fosfatasa SHP-1 en próstata ventral de rata²⁶², en próstata humana normal y tumoral y en las líneas celulares de carcinoma prostático humano PC3 y LNCaP³⁰. En cuanto a su función en este tejido, hemos demostrado que esta proteína regula los niveles, la localización y la actividad de diversas moléculas implicadas en el control del ciclo celular, ya que la pérdida de expresión de SHP-1 en células PC3 inhibió su proliferación mediante una parada del ciclo en la transición G₁/S⁵⁷. Sorprendentemente, además encontramos la presencia de SHP-1 tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células PC3. A la vista de estos resultados en este trabajo nos planteamos estudiar si SHP-1 regula la expresión génica mediante el control de las modificaciones epigenéticas.

En este trabajo hemos utilizado las líneas de cáncer de próstata LNCaP y PC3, que representan *in vitro* diferentes estadios de agresividad del tumor. Las PC3 representan estadios tardíos de la enfermedad, no expresan el receptor de andrógenos (AR) por lo que su crecimiento es independiente de estos, y muestran un comportamiento más agresivo. Por otro lado, las LNCaP expresan AR teniendo un crecimiento dependiente de ellos y se comportan de manera similar a los primeros estadios de la patología. En primer lugar, se analizó la expresión de SHP-1 y la localización de esta enzima en estas líneas celulares. Como se muestra en la figura 4.1, los niveles de expresión tanto de la proteína como del RNAm fueron superiores en las células LNCaP. En ambos tipos celulares, SHP-1 se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo, como indican los resultados de fraccionamiento subcelular (figura 4.2.A) y las imágenes de microscopía confocal (figura 4.2.B).

A)



B)

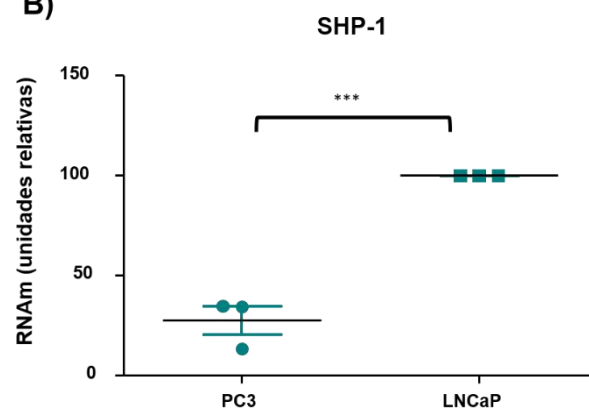


Figura 4.1. Niveles de expresión de SHP-1 en células de carcinoma prostático. Se analizaron los niveles de expresión de SHP-1 en las líneas PC3 y LNCaP (A) mediante *Western blot* utilizando como control de carga la β -tubulina y (B), mediante qRT-PCR utilizando como gen endógeno *Gapdh*. Cada uno de los puntos representa los datos obtenidos en tres experimentos independientes (** $p < 0,001$ versus LNCaP).

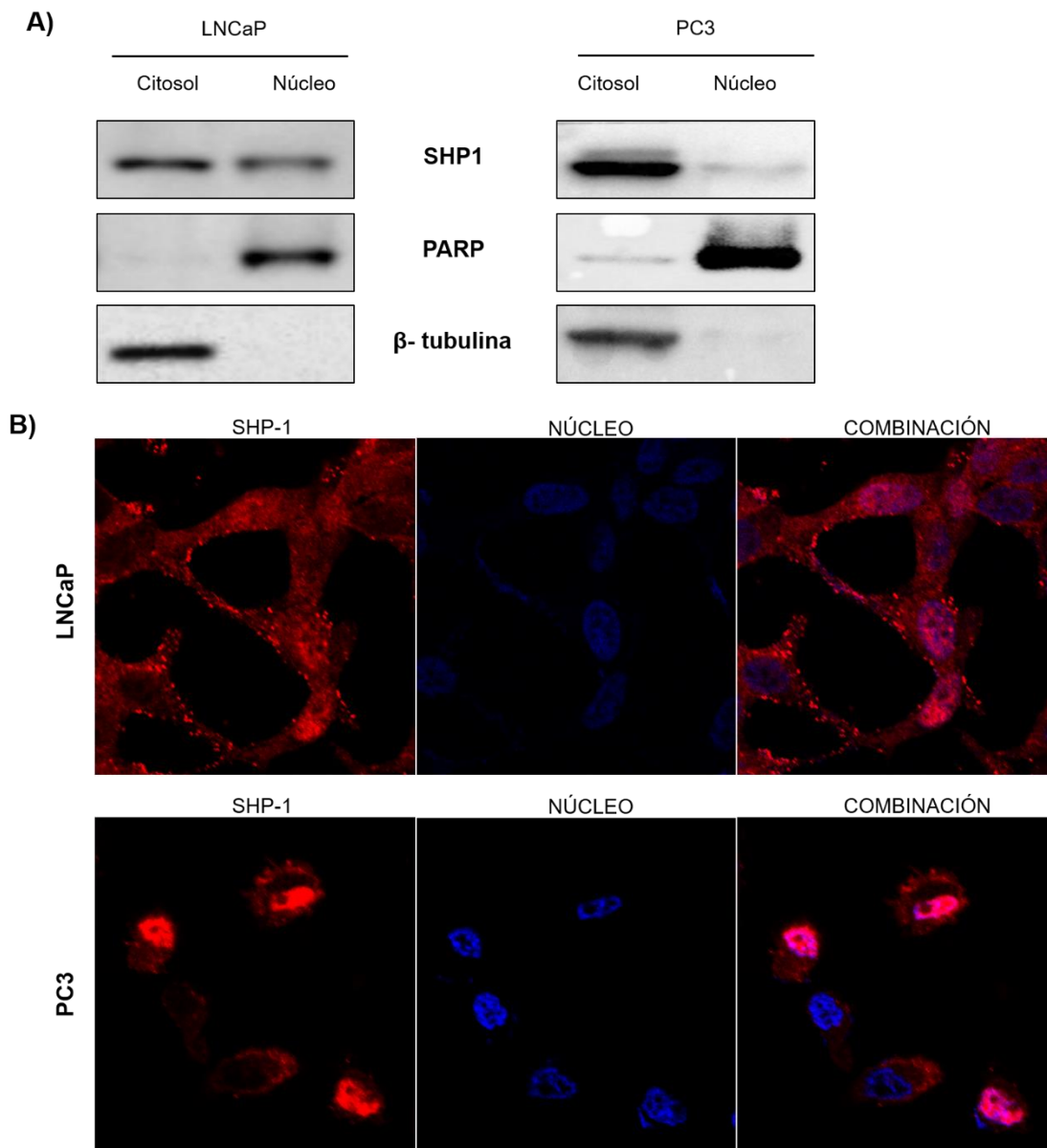
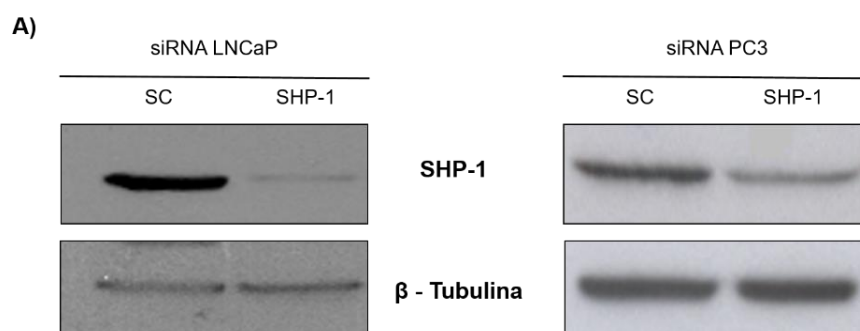


Figura 4.2. Localización subcelular de SHP-1. (A) Se analizaron los niveles de SHP-1 en las fracciones citosólicas y nucleares de las células LNCaP y PC3 mediante *Western blot*; se utilizaron como marcadores específicos de estas fracciones PARP para la fracción nuclear y β -tubulina para la fracción citosólica. (B) Se estudió la localización subcelular de SHP-1 en células LNCaP y PC3 mediante microscopía confocal; se utilizó un anticuerpo específico anti-SHP-1 más un anticuerpo conjugado con un fluoróforo, y se usó DAPI para teñir el núcleo. Las muestras se visualizaron con un microscopio de fluorescencia.

1. Efecto de la anulación de SHP-1 sobre la metilación de los promotores en líneas de cáncer de próstata

La metilación del DNA es una de las modificaciones epigenéticas mejor estudiadas y cuyos efectos sobre la expresión génica resultan más evidentes. Por lo tanto, en primer lugar, quisimos analizar si la ausencia de SHP-1 modificaba los patrones de metilación en las líneas de cáncer de próstata LNCaP y PC3, utilizando el *array* de metilación de *GoldenGate Methylation Cancer Panel I (Illumina)*. Esta plataforma nos permite conocer el estado de metilación de 1.505 sitios CpGs localizados en la región promotora de 807 genes, entre los que encontramos genes supresores de tumores, oncogenes, genes implicados en la reparación del DNA, apoptosis, regulación del ciclo celular, diferenciación y genes imprintados. Las CpGs analizadas se localizan tanto en islas CpGs canónicas (1.044) como fuera de ellas (461).

La anulación transitoria de la proteína se llevó a cabo empleando RNAs pequeños de interferencia (siRNA), específicos para la región codificante de este gen (*ptpn6*), utilizando como control un siRNA que no reconoce ningún gen humano (SC), tal y como se detalla en materiales y métodos. La anulación de SHP-1 se comprobó mediante *Western blot* y PCR a tiempo real (qRT-PCR). En la figura 4.3A podemos observar, que este tratamiento disminuye los niveles proteicos alrededor de un 95% en las células LNCaP y un 85% en las PC3. En el mismo sentido la figura 4.3B muestra una disminución de los niveles de RNAm de SHP-1 muy similar a la observada a nivel proteico. Una vez comprobada la eficiencia del silenciamiento de esta proteína, se extrajo DNA de estas células y se comparó su perfil de metilación mediante el *array* de metilación *GoldenGate Methylation Panel I*.



B)

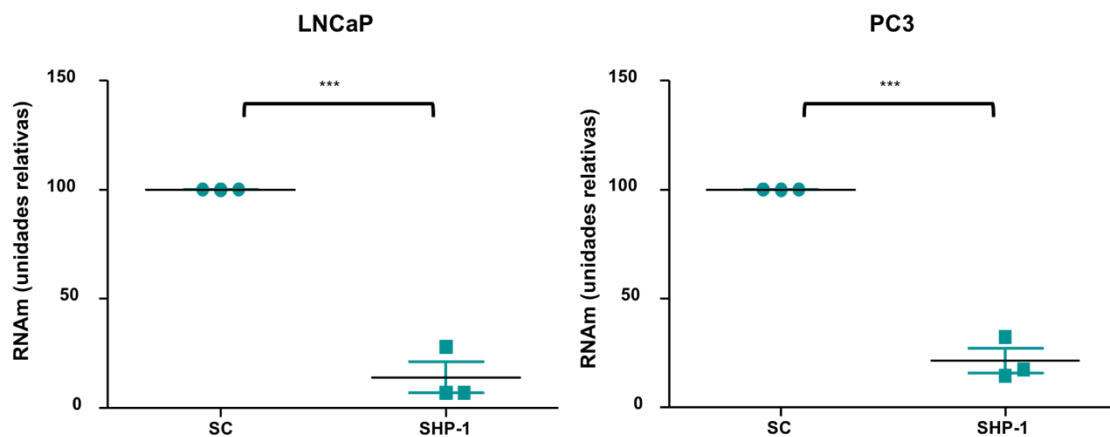


Figura 4.3. Anulación transitoria de la expresión de SHP-1. Se analizaron los niveles de SHP-1 en las células LNCaP y PC3 transfectadas de manera transitoria con siRNA específico para SHP-1 (A) mediante *Western blot* utilizando como control de carga la β -tubulina y (B) mediante qRT-PCR utilizando como gen endógeno *Gapdh*. Cada uno de los puntos representa los datos obtenidos en tres experimentos independientes (***) $p < 0,001$ versus LNCaP).

Como ya describimos en materiales y métodos estos *arrays* proporcionan un valor de metilación (β) entre 0 y 1, donde 1 indica que esa CpG está completamente metilada y 0 que no lo está. Los *Scatter plots* que se representan en la figura 4.4 muestran que la pérdida de expresión de SHP-1 solo produjo cambios de metilación en las células LNCaP, lo que parecía lógico ya que estas son las que más SHP-1 expresan, pero sorprendentemente estos cambios se producían solo en una dirección, la pérdida de metilación en las células en las que se anuló la expresión de SHP-1.

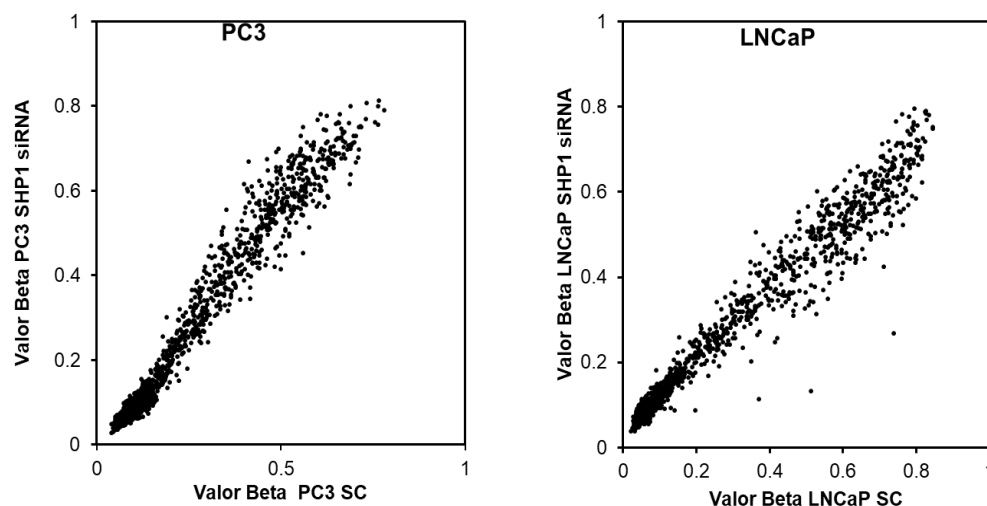


Figura 4.4. Análisis no supervisado de los perfiles de metilación en PC3 y LNCaP en ausencia de SHP-1. Los *Scatter plots* representan los niveles de metilación totales de cada uno de los sitios CpGs obtenidos mediante el *array* de metilación *GoldenGate Methylation Panel I* en ausencia de SHP-1 (SHP-1) y el control (SC). La metilación puede variar en un rango de 0 a 1, siendo 0 las sondas no metiladas y 1 las sondas completamente metiladas.

Para seleccionar las sondas diferencialmente metiladas como consecuencia de la pérdida de expresión de SHP-1 establecimos como criterio una diferencia de metilación de 0,2. Estipulamos este punto de corte de acuerdo con el trabajo de Bibikova *et al.* donde demuestran que esta plataforma es capaz de discriminar diferencias de metilación de 0,17^{263,264}. Además, tal y como hemos descrito en la introducción, la demetilación del DNA puede realizarse mediante una demetilación activa gracias a las TET o a una demetilación pasiva por la sucesión de replicaciones del DNA unido a la pérdida de actividad de DNMTs⁹³. Dado que las muestras provienen de anulaciones transitorias realizadas durante 72 horas, consideramos que no es tiempo suficiente para que la metilación cambie drásticamente, sobre todo si lo que se está induciendo es una demetilación pasiva.

El procesamiento de los datos reveló que en las células PC3 la pérdida de expresión de SHP-1 no provoca cambios en los niveles de metilación de las CpGs analizadas. Sin embargo, si se identificaron sondas diferencialmente metiladas en la línea LNCaP, pero curiosamente, como se intuía en los *Scatter plots*, todas las diferencias detectadas mostraban una disminución de los niveles de metilación en las células que no expresaban SHP-1 (tabla 4.1). Además, los valores de metilación de los genes seleccionados en las células LNCaP SHP-1 son muy similares a los de las células PC3, que expresa niveles más bajos de SHP-1, lo que apoya la idea de que la disminución en la metilación observada sea consecuencia de la disminución de la expresión y de la función de SHP-1.

Tabla 4.1: Genes con diferentes perfiles de metilación cuando no se expresa SHP-1. En la tabla se muestran los genes seleccionados con una diferencia de metilación >0,2, entre los niveles de metilación de las células control (LNCaP SC) y aquellas en las que se ha anulado la expresión de SHP-1 (LNCaP siRNA SHP-1). Además, se muestran los niveles de metilación en las células PC3. Los niveles de metilación pueden variar desde 0 que es no metilado a 1 que es completamente metilado.

Gen	Proteína	LNCaP		PC3
		SC	siRNA	SC
NPY	Neuropéptido Y	0.79941	0.58457	0.12028
DDR2	Receptor tirosina quinada 2 con dominio de discoidina	0.77788	0.57004	0.55293
PTCH2	<i>Patched Homolog 2</i>	0.76641	0.56064	0.1921
TNFSF8	Factor de necrosis tumoral 8	0.76482	0.52273	0.6189
GNG7	Proteína G con subunidad gamma	0.75656	0.55188	0.50585
FMR1	Síndrome del X frágil	0.73889	0.26788	0.19049
TBX1	Factor transcripcional T-Box	0.73042	0.52587	0.5004

RARβ	Receptor de ácido retinoico β	0.72959	0.52012	0.19205
NEFL	Neurofilamento ligero	0.72063	0.50263	0.12806
Gstp1	Glutation S-transferasa	0.71218	0.42409	0.34646
PTGS2	Prostaglandina endoperoxidasa sintasa	0.70752	0.50748	0.42914
Kit	Proto-oncogen receptor tirosina quinasa KIT	0.65943	0.44385	0.4196
RARα	Receptor de ácido retinoico α	0.63362	0.433	0.39452
MET	Proto-oncogen receptor tirosina quinasa MET	0.59653	0.39573	0.10365
IGFBP3	Factor de crecimiento similar a insulina 3	0.55834	0.34979	0.09744
Hin-1	Secretoglobulina familia 3A	0.52704	0.31401	0.14162
RunX1T1	Factor de transcripción translocado relacionado con Runt 1	0.51223	0.13198	0.12974
CDKN1A	Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1A	0.37006	0.11281	0.0987

Mediante un análisis de ontología génica (GO), se observó que los genes seleccionados estaban implicados en procesos relacionados con la regulación de la muerte celular programada, la proliferación, la diferenciación y la migración celular, entre otros (figura 4.5). Cabe destacar, que entre los genes que disminuyen sus niveles de metilación en LNCaP SHP-1 se encuentra *Gstp1*, que está hipermetilado en el 90% de los tumores de próstata y es uno de los marcadores epigenéticos mejor establecidos²⁶⁵.

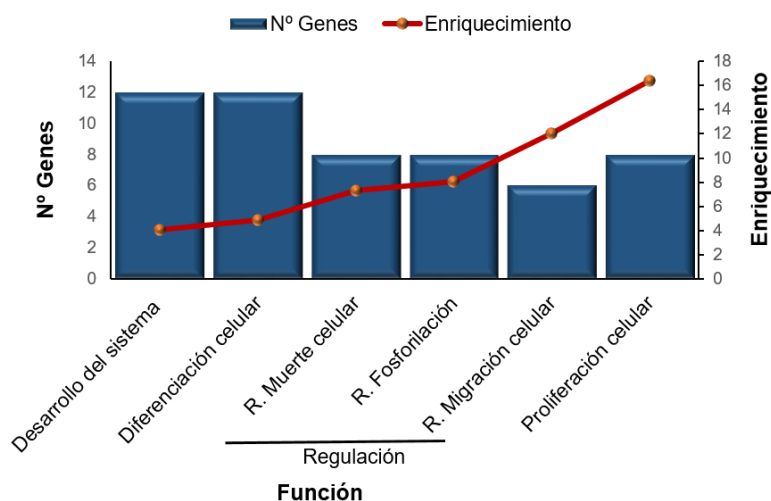


Figura 4.5. Análisis de ontología génica de los genes diferencialmente metilados en las células LNCaP que no expresan SHP-1. Se muestran los procesos biológicos enriquecidos tras la anulación de SHP-1.

2. Efecto de la anulación SHP-1 sobre la expresión génica desde un punto de vista epigenético

La metilación del DNA es una modificación epigenética directamente relacionada con la expresión génica; concretamente, los promotores metilados están asociados con la represión de la expresión génica, por lo que la pérdida de metilación observada en las células que no expresan SHP-1 debería estar asociada con un aumento de la expresión respecto a la línea celular LNCaP SC. Por ello, a continuación, se cuantificaron los niveles de expresión de los genes seleccionados en el apartado anterior mediante qRT-PCR, en células LNCaP SC y LNCaP SHP-1. Una vez establecidas las condiciones óptimas para la reacción, se procedió a estudiar cada uno de los 18 genes seleccionados.

Tras la normalización de los datos de cada gen respecto a los valores del control endógeno, *Gapdh*, se compararon los valores relativos de expresión de las células LNCaP SHP-1 con los de las LNCaP SC. De los 18 genes, tan solo 8 (*Runx1T1*, *NPY*, *Gstp1*, *Kit*, *CDKN1A*, *PTCH-2*, *Hin-1* y *RAR β*) mostraron un aumento de expresión en ausencia de SHP-1 (figura 4.6). En algunos casos los errores obtenidos son muy elevados, lo que podría deberse a que cada uno de los experimentos se realizó con anulaciones transitorias independientes. Sin embargo, los resultados siempre presentan la misma tendencia, un aumento de la expresión de estos, lo que podría deberse a la disminución de la metilación observada en ausencia de SHP-1.

Para determinar si los cambios en la expresión observados se debían a cambios en la metilación, tratamos las células LNCaP con el agente demetilante 5'-aza-2'-deoxicitidina (5'-Aza). Este compuesto es un análogo del nucleósido natural 2'-deoxicitidina, que se incorpora al DNA durante la replicación, uniéndose de manera covalente a las DNMTs inhibiendo, de esta forma, su actividad e impidiendo que se restauren los patrones de metilación en las células hijas²⁶⁶. De esta manera se disminuye la metilación permitiendo que los genes que tienen su promotor metilado puedan expresarse.

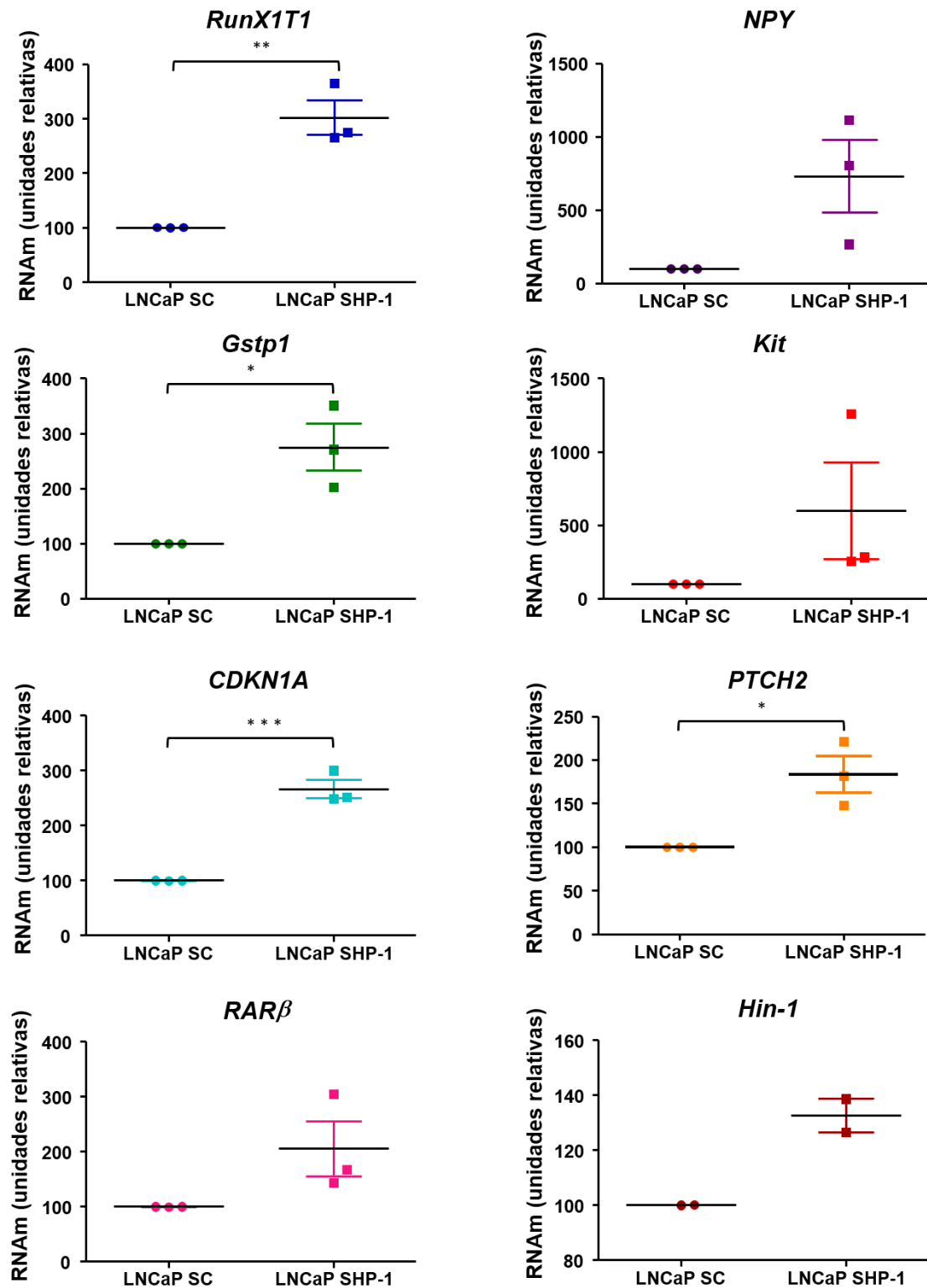


Figura 4.6. Efectos de la anulación transitoria de SHP-1 sobre la expresión génica. Se anuló la expresión de SHP-1 en células LNCaP mediante siRNA y se analizó la expresión de los genes indicados mediante qRT-PCR utilizando como control endógeno *Gapdh*. Cada uno de los puntos representa los datos obtenidos en tres experimentos independientes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,001$ versus SC).

Tal como se observa en la figura 4.7, tras el tratamiento con 5'-Aza se produce un aumento de la expresión de todos los genes excepto en *CDKN1A* y *RAR β* que no mostraron diferencias en los niveles de RNAm al tratar con el agente demetilante (datos no mostrados). Estos resultados confirman que para los genes *Runx1T1*, *NPY*, *Gstp1*, *Kit*, *PTCH-2* y *Hin-1* el aumento en la expresión observado tras la anulación de SHP-1 se debe a la disminución en la metilación observada en el *array*.

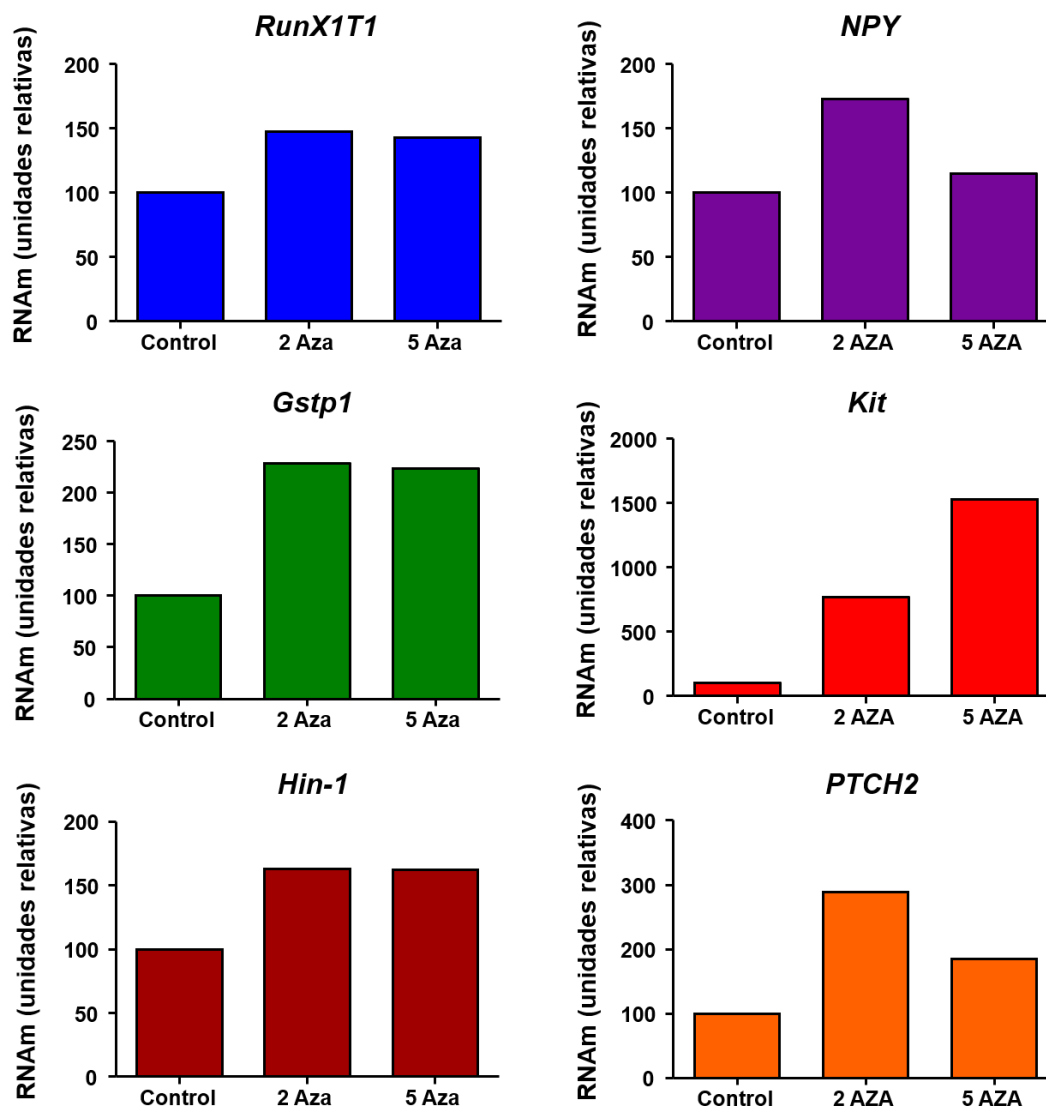


Figura 4.7. Análisis de la expresión de los genes en células LNCaP tratadas con 5'-Aza. Se analizaron, mediante qRT-PCR, los niveles de expresión de los genes seleccionados en células LNCaP tratadas durante 4 días con 5'-Aza a diferentes concentraciones (2 μ M y 5 μ M), como se describe en materiales y métodos. Se utilizó como gen endógeno *Gapdh*. Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

A continuación, determinamos los niveles de expresión de estos seis genes en la línea celular PC3, que presenta niveles de SHP-1 más bajos y donde los valores de metilación observados fueron muy similares (*RunX1T1*, *Gstp1* y *Kit*) e incluso

inferiores (*NPY*, *PTCH2* y *Hin-1*) a los obtenidos en las células LNCaP al anular la expresión de SHP-1. Como se muestra en la figura 4.8 la expresión de *NPY*, *RunX1T1* y *Gstp1* es mayor en la línea PC3, pero no así con el resto de los genes estudiados.

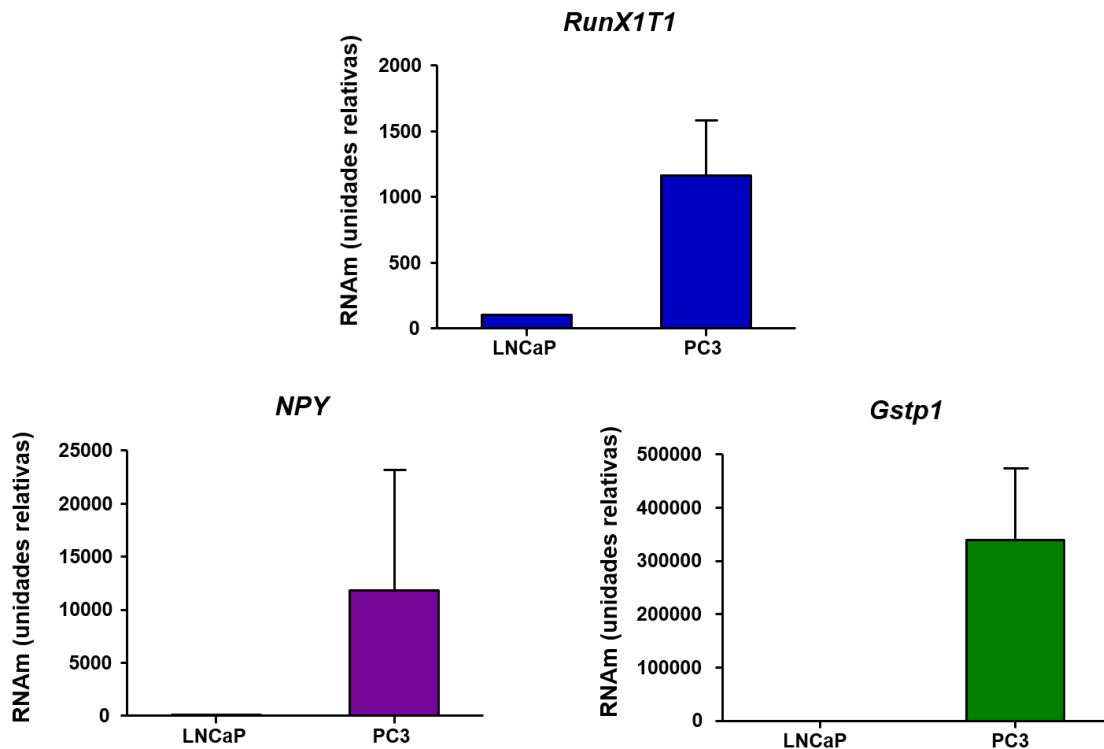


Figura 4.8. Niveles de expresión de los genes seleccionados en líneas de cáncer de próstata. Se cuantificó, mediante qRT-PCR, los niveles de expresión de los genes que presentaban aumento de expresión en ausencia de SHP-1 en las diferentes líneas de cáncer prostático, LNCaP y PC3. Los resultados son medias \pm SEM de tres experimentos independientes.

En resumen, los datos presentados hasta ahora indican que la pérdida de expresión de SHP-1 en las células LNCaP aumenta los niveles de RNAm de *Runx1T1*, *NPY*, *Gstp1*, *Kit*, *PTCH-2* y *Hin-1*, provocado, probablemente, por la pérdida de metilación de su región promotora.³ Efecto de la anulación de SHP-1 sobre la metilación global de LNCaP y PC3.

Una vez demostrado que SHP-1 podría estar regulando la expresión génica mediante el control de la metilación, nos propusimos ampliar el estudio en el mismo modelo celular utilizando el *array* de metilación *Infinium HumanMethylation450K BeadChip* (*Illumina* que, en aquellos momentos, se acababa de comercializar y validar. Esta plataforma nos permite determinar el estado de metilación de más de 450.000 CpGs distribuidas a lo largo de todo el genoma, lo que resulta de gran interés, ya que como describimos en la introducción, la metilación del DNA tiene un papel fundamental en la regulación de la expresión génica, pero su efecto es diferente en función de la

región que se encuentre metilada²⁶⁷. Además, nos permitió ampliar el análisis a todos los genes conocidos.

Este estudio se realizó de manera similar al descrito anteriormente utilizando las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP y PC3, en las que se silenció de manera transitoria la expresión de SHP-1 con un siRNA. En el caso de las PC3 como ya ocurrió con la anterior plataforma, no se observaron grandes diferencias en la metilación en ausencia de SHP-1 como muestra el *Scatter plot* de la figura 4.9.

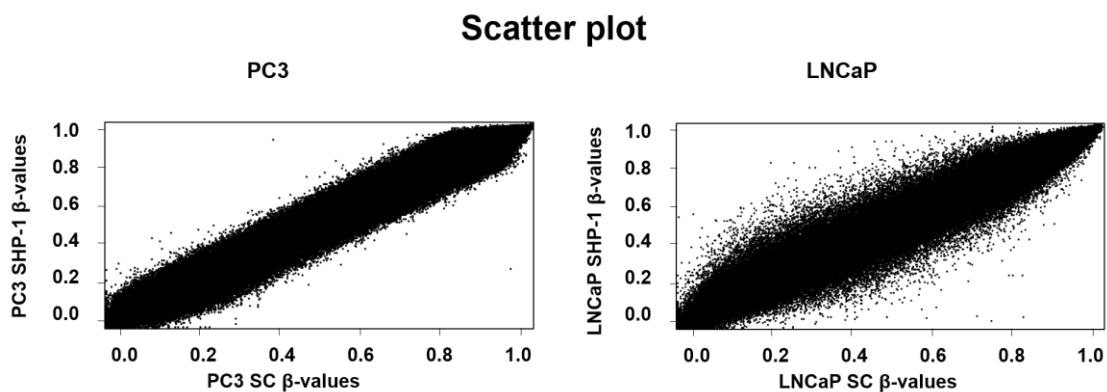


Figura 4.9. Análisis no supervisado de los perfiles de metilación en PC3 y LNCaP en ausencia de SHP-1. Los *Scatter plots* representan los niveles de metilación totales de cada uno de los sitios CpGs obtenidos mediante el *array* de metilación *Infinium HumanMethylation450K BeadChip* en ausencia de SHP-1 (SHP-1) y el control (SC). La metilación puede variar en un rango de 0 a 1, siendo 0 las sondas no metiladas y 1 las sondas completamente metiladas.

Más interesantes son los datos obtenidos en las células LNCaP donde observamos que en las células LNCaP hay un mayor número de sondas diferencialmente metiladas que en las células PC3 (figura 4.9), de igual modo que habíamos visto con la plataforma *GoldenGate*. Además, encontramos que las LNCaP SC presentan mayor número de sondas hipometiladas (2.984 CpGs), pero curiosamente también presentan más sondas hipermetiladas (2.717 CpGs) (figura 4.10). Por ello, decidimos continuar el estudio únicamente con las células LNCaP al igual que hicimos con la plataforma *GoldenGate*.

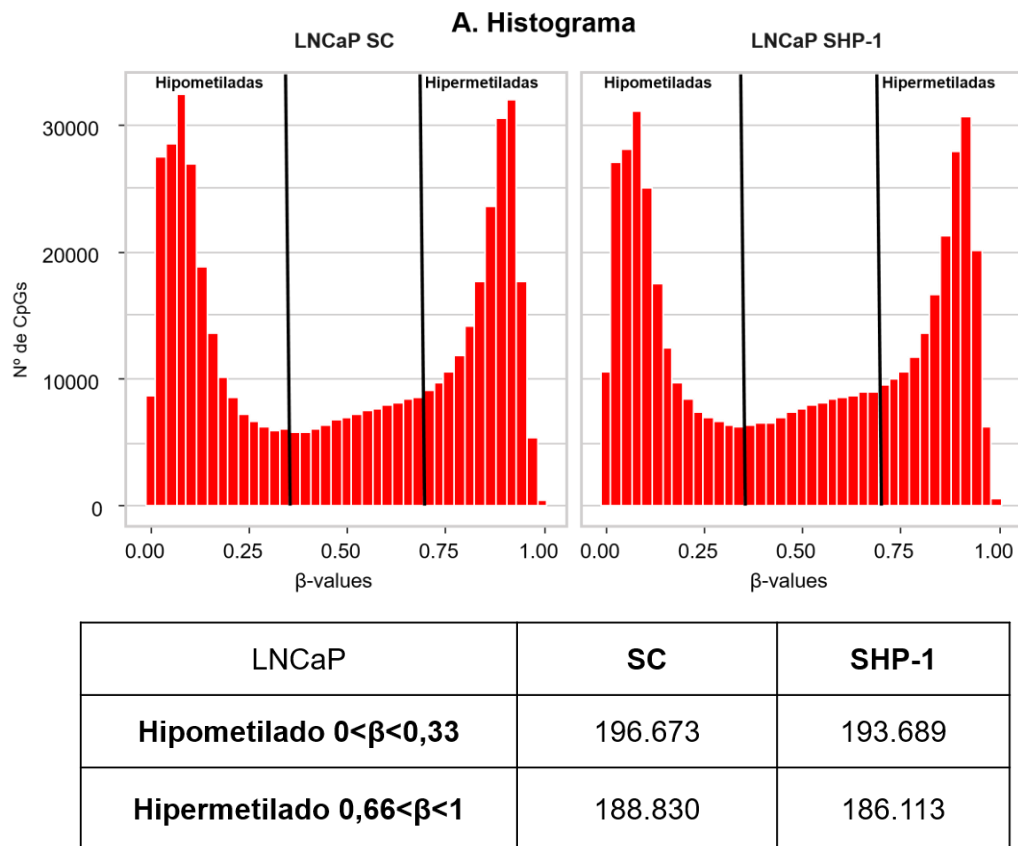


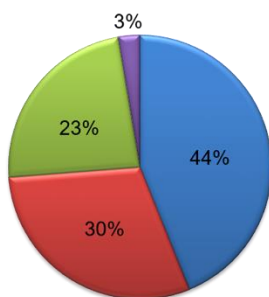
Figura 4.10: Análisis no supervisado de los perfiles de metilación en LNCaP en ausencia de SHP-1. Los histogramas muestran el nivel de metilación de todas las CpGs estudiadas en ausencia de SHP-1 (SHP-1) y en el control (SC). En la tabla se puede observar el número de CpGs que se encuentran poco metiladas ($\beta\text{value} < 0,33$) y las que se encuentra más metiladas ($\beta\text{value} > 0,66$). La metilación puede variar en un rango de 0 a 1, siendo 0 las sondas no metiladas y 1 las sondas completamente metiladas.

Con el fin de identificar genes diferencialmente metilados al anular la expresión de SHP-1, al igual que describimos en el caso de la plataforma *GoldenGate*, establecimos en primer lugar que la diferencia de metilación entre SC y SHP-1 debía ser mayor de 0,2. De esta manera, consideramos sondas hipermetiladas a aquellas que además de cumplir la diferencia de metilación establecida, presenten un valor de metilación en las LNCaP SC menor de 0,3 e hipometiladas a aquellas cuyo valor sea mayor de 0,7.

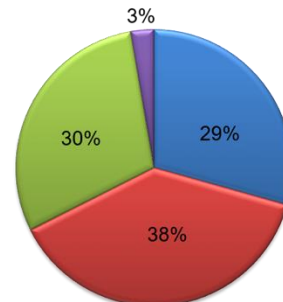
Este análisis nos permitió identificar 259 sondas **hipometiladas** en las células LNCaP SHP-1 que pertenecían a 164 genes. El estudio de ontología génica de estos reveló un incremento en el porcentaje de genes implicados en funciones de desarrollo de tejido muscular y del sistema nervioso (figura 4.11D). Esta pérdida de metilación afectaba principalmente a secuencias con baja densidad de CpGs (figura 4.11C) y, tan solo un 29% de las mismas se localizaban en la región promotora de 71 genes (figura 4.11B). Así mismo, seleccionamos 1.235 sondas **hipermetiladas** en las células que no expresan SHP-1 correspondientes a 636 genes, que además de estar implicados en el

desarrollo del sistema nervioso y esquelético, lo están en migración, adhesión y proliferación celular (figura 4.11E). Además, observamos que estas diferencias de metilación afectaban de igual modo a secuencias ricas y pobres en CpGs (figura 4.11C). Tal como muestra la figura 4.11A, el porcentaje más elevado de sondas hipermetiladas se encuentra en la región promotora de genes conocidos (44%). Mientras que el porcentaje más elevado de las sondas que pierden metilación se localizan en el cuerpo de los genes.

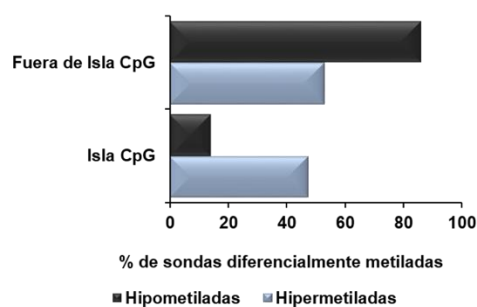
A) LNCaP sondas hipermetiladas



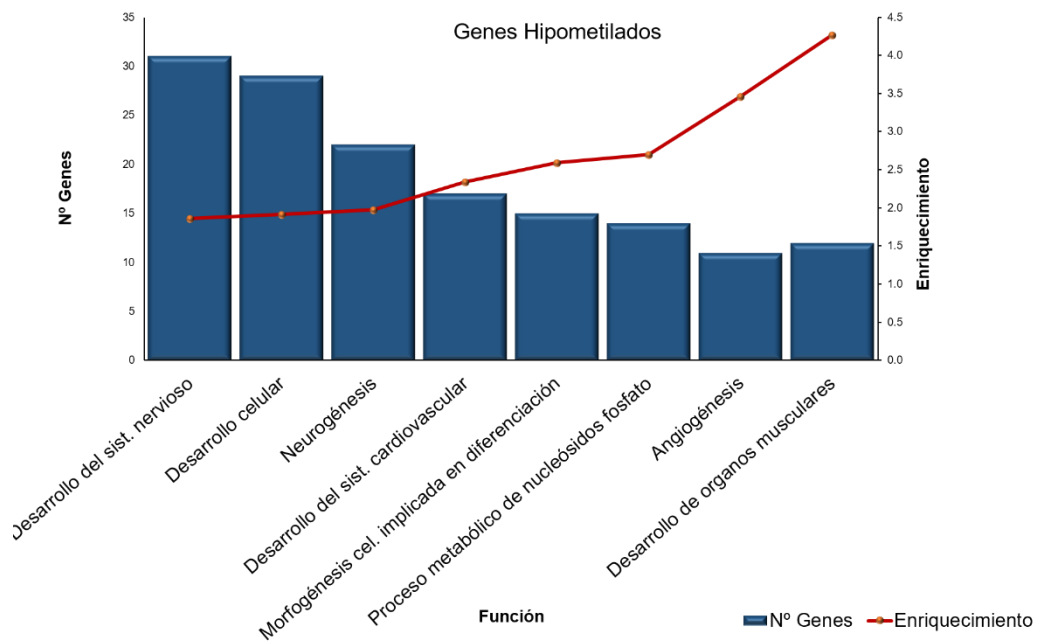
B) LNCaP sondas hipometiladas



C) Tipo de secuencia



D)



E)

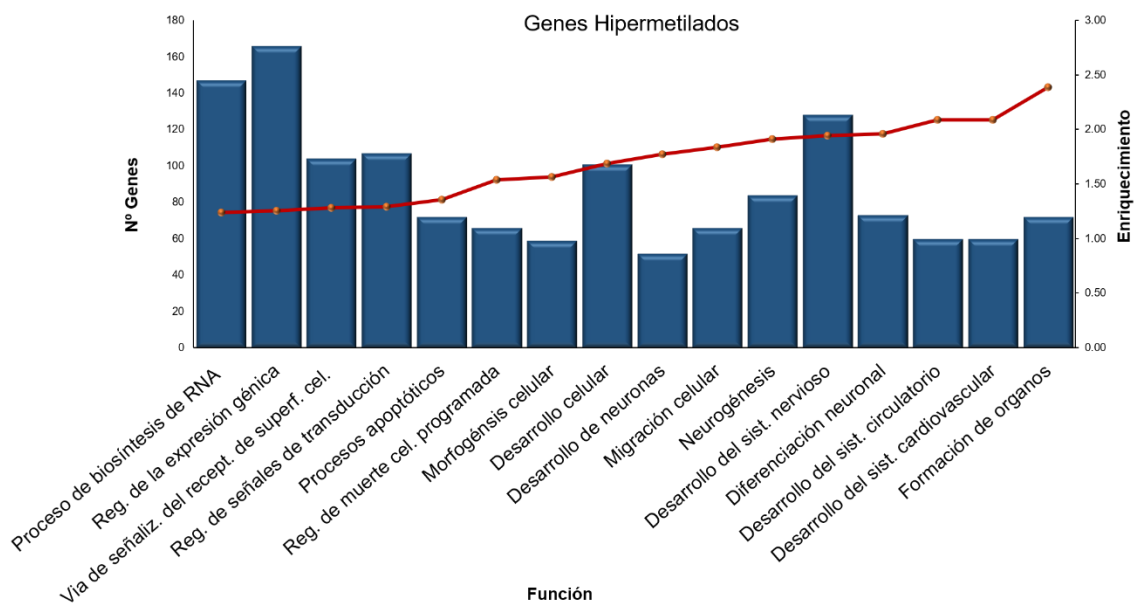


Figura 4.11. Distribución genómica de las CpGs hipermetiladas e hipometiladas en células LNCaP en ausencia de SHP-1 respecto al control. (A - B) Representación gráfica de la distribución de las sondas diferencialmente metiladas en las regiones del genoma. (C) Sondas diferencialmente metiladas en LNCaP y su clasificación en base al sentido de cambio y al tipo de secuencia afectada. (D) Análisis de ontología génica en células LNCaP de genes que pierden metilación de los promotores en ausencia de SHP-1. (E) Análisis de ontología génica en células LNCaP que aumentan el nivel de metilación de la región promotora al anular la expresión de SHP-1.

De todos los genes diferencialmente metilados, en este trabajo nos centramos en aquellos cuyos cambios se producen en la región promotora ya que, aunque hoy en día se conoce más en detalle la función de la metilación fuera de esta región, esta aún no está bien establecida. Otro criterio de selección fue que los genes codificasen para proteínas cuyos cambios en su expresión y/o función pudiese tener un papel relevante en el desarrollo del cáncer de próstata. De este modo de los 71 genes cuyo promotor se encontraba **hipometilado** en ausencia de SHP-1 se seleccionó el gen *FHL-1*, que codifica para una proteína que inhibe la proliferación celular e induce apoptosis en células de cáncer de mama y de pulmón²⁶⁸⁻²⁷¹. Por otro lado, de los 386 genes en los que **aumentaba la metilación** en la región promotora, se seleccionaron los genes *CEBPD* y *CDCA7L*: *CEBPD* codifica para un factor de transcripción que reconoce la secuencia CCAAT e inhibe el crecimiento de cáncer de próstata²⁷², además de estar implicado en la regulación de genes proapoptóticos en otros tejidos²⁷³; *CDCA7L* codifica para una proteína que promueve la progresión del carcinoma hepatocelular mediante la regulación del ciclo celular²⁷⁴. Este *array* nos permitió analizar 2 CpGs de la región promotora de *FHL-1* ubicadas en el TSS1500, cuyos valores de metilación disminuían entre un 0,5 y un 0,21. También se estudiaron 5 CpGs de *CEBPD* localizadas en la región promotora, concretamente una CpG en el TSS1500, 2 en el TSS200 y otras 2 en el primer exón, observando que en cada una de ellas se producía un aumento de metilación en ausencia de SHP-1 con unos valores que oscilaban entre 0,23 y 0,52. En cambio para *CDCA7L* se estudiaron 7 CpGs ubicadas en el promotor, cuyos valores de metilación aumentaban entre 0,2 y 0,43 respecto del control.

4. Efecto de la anulación estable de SHP-1 sobre la expresión génica en cáncer de próstata.

Los resultados mostrados hasta el momento indican que SHP-1 regula la expresión génica, al menos en parte, mediante cambios en la metilación del DNA. Para comprobar si estos efectos se mantienen en el tiempo tras la pérdida de expresión de SHP-1, y de este modo aproximarnos a lo que ocurre en los tumores de próstata que pierden la expresión de esta fosfatasa, a continuación, decidimos desarrollar un modelo de silenciamiento estable de SHP-1 en las líneas celulares LNCaP y PC3 y continuar el estudio en este sistema. Para ello, transfectamos ambas líneas celulares con partículas lentivirales MISSION (Sigma-Aldrich) a 4 MOI (multiplicidades de infección) en medio con bromuro de hexadimetrina, tal y como se detalla en materiales y métodos. Estas partículas lentivirales contienen un siRNA contra SHP-1 y un gen que les confiere resistencia a puomicina, lo que permite

seleccionar solamente aquellas células que contengan las partículas lentivirales, consiguiendo así una anulación estable de SHP-1. Se utilizaron 4 tipos de partículas lentivirales (A-D) que contienen siRNAs dirigidos a diferentes secuencias de la región codificante de SHP-1. Por ejemplo, la partícula lentiviral B contiene un siRNA que reconoce una secuencia del exón 10 del gen que codifica para SHP-1 (*ptpn6*), el cual es una de las dianas utilizadas en las anulaciones transitorias que realizamos. La figura 4.12 muestra los niveles proteicos de SHP-1 en las células LNCaP y PC3 tras la transfección con cada una de las partículas lentivirales utilizadas.

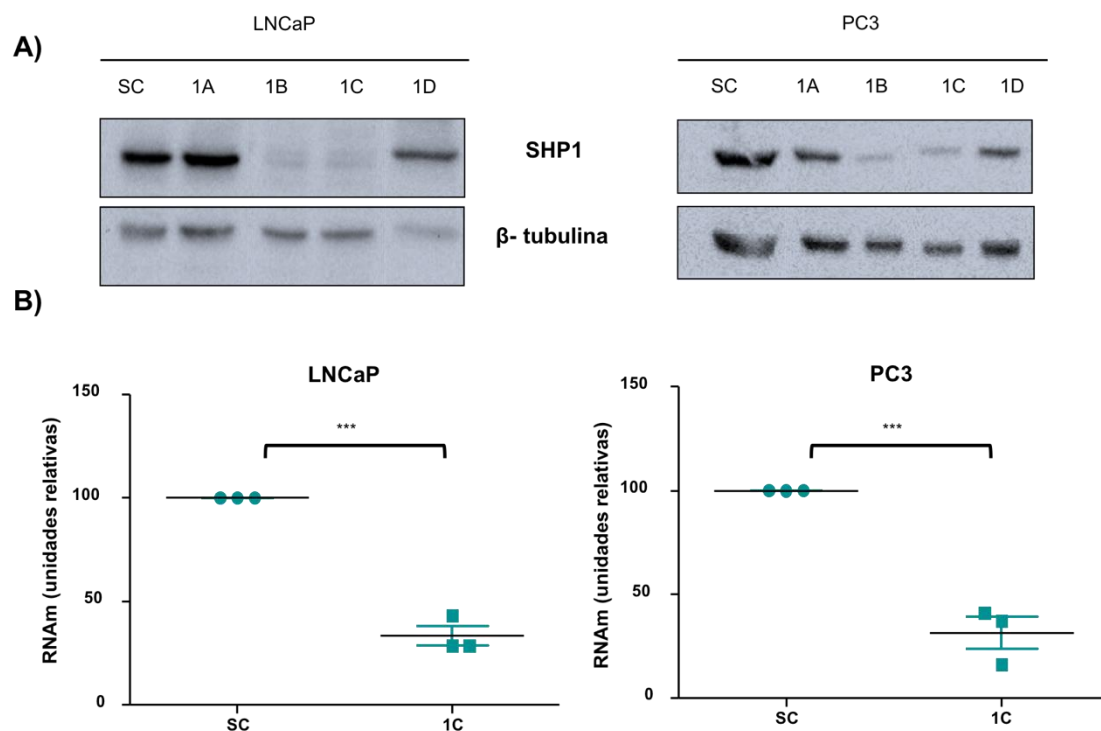


Figura 4.12. Niveles de SHP-1 en los modelos celulares estables generados mediante partículas lentivirales. Se analizaron los niveles de SHP-1 en las células LNCaP y PC3 transfectadas previamente con partículas lentivirales, (A) mediante *Western blot* utilizando como control de carga la β -tubulina y (B) mediante qRT-PCR utilizando como gen endógeno *Gapdh*. Cada uno de los puntos representa los datos obtenidos en tres experimentos independientes (** $p < 0,001$ versus SC).

Aunque tal como se observa en la figura 4.12A, las células transfectadas con las partículas lentivirales 1B y 1C muestran una marcada anulación de la proteína SHP-1, finalmente decidimos continuar trabajando con el lentivirus 1C, ya que los distintos experimentos realizados con el lentivirus 1B mostraron diferentes niveles de anulación de nuestra proteína.

Una vez demostrada la anulación de SHP-1, y que esta se mantiene en el tiempo, el primer paso fue confirmar los resultados obtenidos en las anulaciones transitorias. En cuanto a los genes seleccionados con la plataforma *GoldenGate* los

resultados obtenidos mostraron un aumento de expresión de los genes *Runx1t1*, *Gstp1* y *Kit* en las células LNCaP 1C (figura 4.13A-C). Por otro lado, contrariamente a lo observado con anterioridad, la expresión de *NPY* disminuyó en las anulaciones estables por lo que decidimos no continuar con el estudio de este gen. En cuanto a los genes *PTCH2*, *RARβ* y *CDKN1A* los estudios de expresión en las anulaciones estables no mostraban cambios de la expresión en ausencia de SHP-1 al contrario de lo demostrado previamente (datos no mostrados).

Paralelamente se determinó la expresión de los genes seleccionados en la plataforma *Infinium*, *FHL-1*, *CDCA7L* y *CEBPD*, en las células que poseen anulación estable de SHP-1 (LNCaP 1C) mediante qRT-PCR. Debemos recordar que esta plataforma nos permitió seleccionar tanto genes para los que disminuyen sus niveles de metilación en LNCaP SHP-1 como sucede con *FHL-1*, como genes que presentan un aumento en sus niveles de metilación como *CDCA7L* y *CEBPD*. En el caso de los genes *FHL-1* y *CDCA7L* no se obtuvieron resultados concluyentes en cuanto a los niveles de RNAm. Sin embargo, los resultados mostraron una disminución de la expresión de *CEBPD* en LNCaP 1C, que concuerda con los datos de metilación obtenidos en el *array* que mostraron un aumento de la metilación en células en las que se anula la expresión de SHP-1 (figura 4.13D).

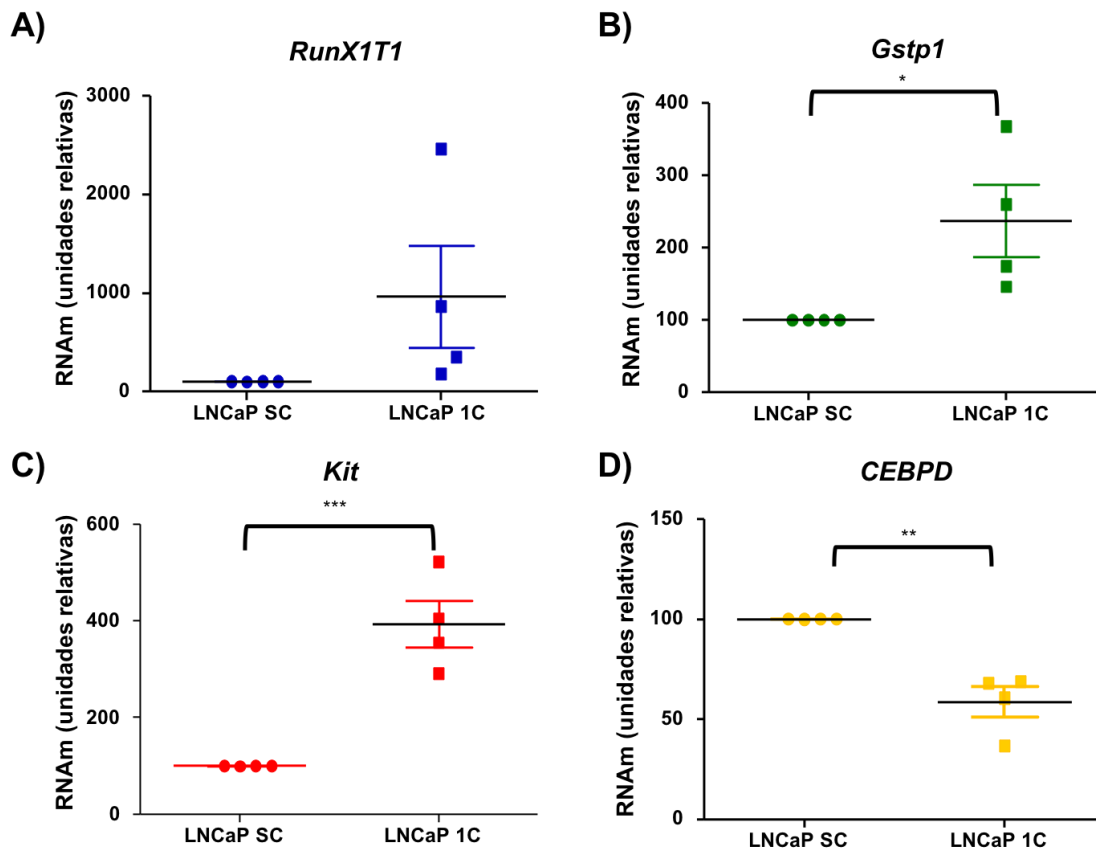
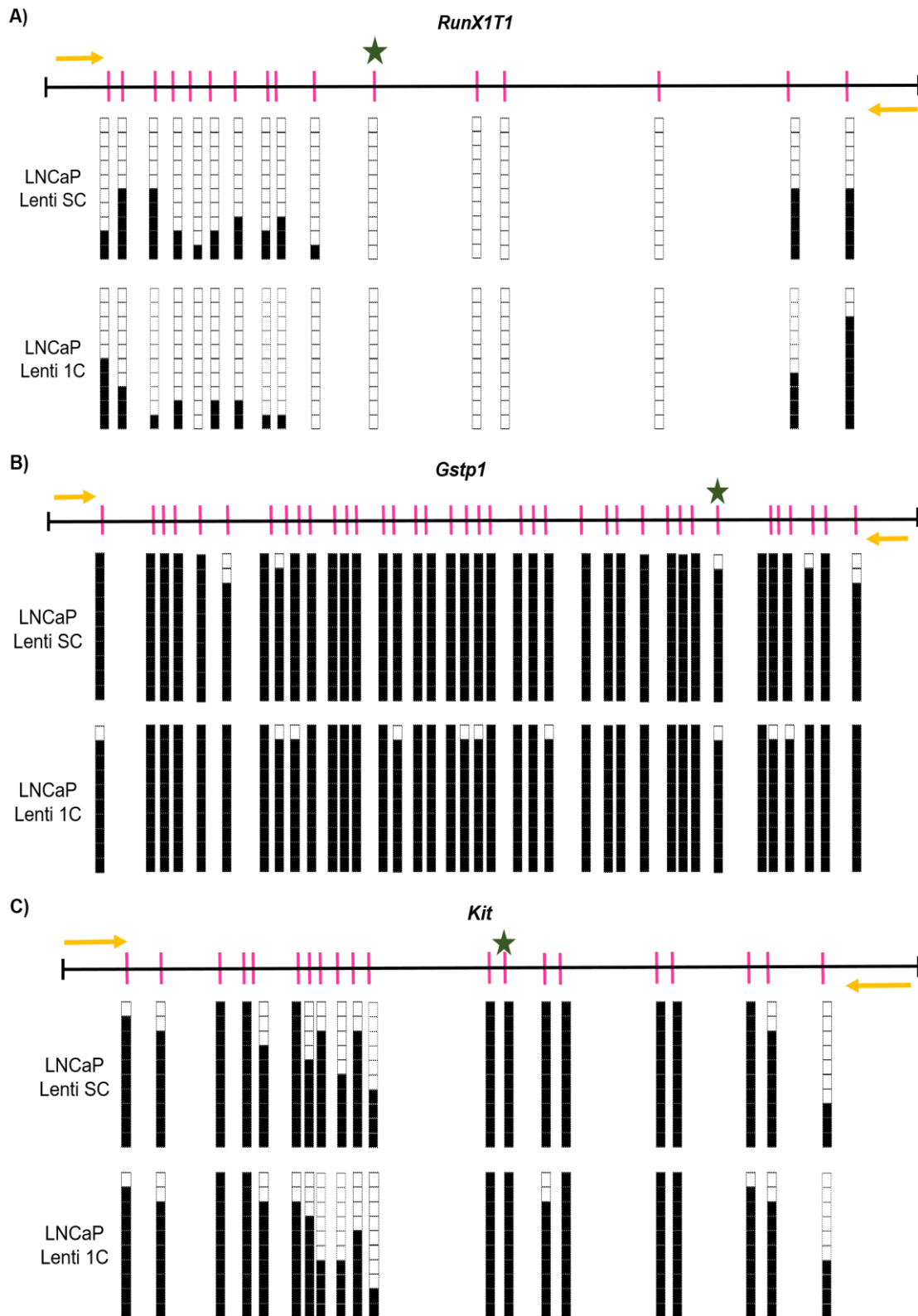


Figura 4.13. Efectos de la anulación estable de SHP-1 en la expresión génica. Se analizaron los niveles de expresión de los genes *RunX1T1*, *Gstp1* y *CEBPD* en las células LNCaP SC y 1C mediante qRT-PCR utilizando como gen endógeno *Gapdh*. Cada uno de los puntos representa los datos obtenidos de cuatro experimentos independientes (** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ versus SC).

Con el fin de validar los resultados de los *arrays* de metilación, se realizó un estudio de secuenciación genómica del DNA tratado con bisulfito sódico de la región promotora de *RunX1T1*, *Gstp1*, *Kit* y *CEBPD*. El tratamiento con bisulfito sódico desamina todas aquellas citosinas que no se encuentran metiladas convirtiéndolas en uracilos y dejando las metiladas intactas, lo que nos permite discriminar las citosinas que se encuentran metiladas de las que no. Tras la replicación del DNA los uracilos se convierten en timinas y las citosinas metiladas permanecen inalteradas. Para estos ensayos, se escogió como secuencia de estudio la región promotora de cada uno de los genes, teniendo especial precaución en incluir las CpGs valoradas en los *arrays*.

El análisis de los resultados obtenidos para los genes *RunX1T1*, *Gstp1* y *Kit* no mostró grandes diferencias en su metilación, pero, aunque ligeras, se producía una disminución de la metilación en las células LNCaP 1C (figura 4.14A-C) que se correlaciona con los datos obtenidos en el *array* de metilación y con el aumento de expresión observado. En el caso de *CEBPD*, observamos que las células que no expresan SHP-1 (LNCaP 1C) presentan un mayor grado de metilación en su región

promotora, datos que están en consonancia con la disminución en la expresión observada (figura 4.14D).



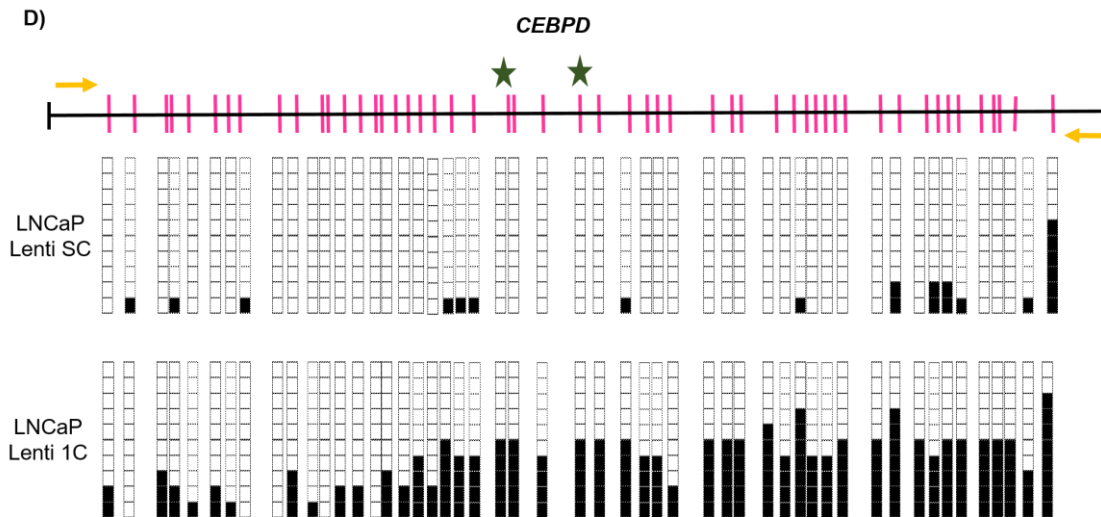


Figura 4.14: Niveles de metilación del promotor de LNCaP en ausencia de SHP-1. Secuenciación genómica de bisulfito en la región promotora de los genes *RunX1T1*, *Gstp1*, *Kit* y *CEBPD* en células LNCaP con anulación estable de SHP-1 (LNCaP SC vs. LNCaP 1C). Se secuenciaron 10 clones de cada una. En negro se representan las CpGs metiladas y en blanco las no metiladas. Cada línea rosa representa un sitio CpG y la estrella indica CpG estudiada en el *array*.

Los datos mostrados hasta el momento indican que en células de cáncer de próstata la pérdida de expresión de SHP-1 provoca un aumento en los niveles de expresión de los genes *RunX1T1*, *Gstp1* y *Kit* y una disminución en la expresión de *CEBPD*, ya que estos cambios se produjeron tanto en las anulaciones transitorias como en las estables. En cuanto al mecanismo, estos cambios podrían deberse, al menos en parte, a cambios en el estado de metilación del DNA en su región promotora.

5. Interacción de SHP-1 con JAK2 en células de carcinoma prostático.

Los resultados mostrados hasta el momento indican que la ausencia de SHP-1 provoca cambios en la expresión de varios genes con importantes funciones en próstata, y que estas diferencias de expresión podrían deberse, al menos en parte, a cambios en la metilación de sus promotores. SHP-1 es una proteína tirosina fosfatasa cuya función hasta el momento no se ha relacionado con los mecanismos epigenéticos de regulación de la expresión génica, por lo que decidimos explorar diferentes posibilidades para explicar el porqué de este fenómeno.

Como describimos en la introducción, SHP-1 interacciona con moléculas de diversas vías de señalización celular regulando su actividad, su localización y/o su interacción con otras proteínas de diferente manera. Por ello, a continuación, nos

propusimos determinar si esta fosfatasa podía estar modulando la actividad de proteínas que regulan las modificaciones epigenéticas, y por tanto la expresión génica. En este sentido, recientemente Dawson *et al.*¹⁹² han descrito que en sistema hematopoyético la quinasa JAK2, cuando se encuentra en el núcleo es capaz de fosforilar la tirosina 41 (Y41) de la histona H3 (H3Y41). Esta fosforilación impide el reclutamiento de la proteína de heterocromatina 1 α (HP1 α) favoreciendo de este modo la expresión génica. Posteriormente, demostraron que la fosforilación de H3Y41 se encuentra relacionada con genes transcripcionalmente activos, ya que se asocia con histonas que presentan la marca H3K4me3¹⁹³. En cuanto a la relación con SHP-1, se ha descrito que en sistema hematopoyético esta fosfatasa inhibe la actividad de JAK2 regulando su fosforilación²⁷⁵. Por lo tanto, es lógico pensar que, en nuestro sistema, la pérdida de SHP-1 podría provocar un aumento en la fosforilación y actividad de JAK2 y por tanto de la fosforilación de H3Y41, activando de este modo, la expresión génica como indican nuestros datos.

Por ello en primer lugar, determinamos los niveles de JAK2 en las líneas de carcinoma prostático LNCaP y PC3. Como se puede observar en la figura 4.15, las células LNCaP expresan mayores niveles de JAK2 que las PC3, al igual que sucede con la expresión de SHP-1. Seguidamente quisimos evaluar los niveles de JAK2 en células que tienen anulada la expresión de SHP-1 tanto de manera transitoria (figura 4.16A) como de manera estable (figura 4.16B). Los resultados indican que en las células LNCaP la pérdida de expresión de SHP-1 provoca un aumento de los niveles de JAK2 tanto en las anulaciones transitorias como las estables, mientras que en las PC3 no se observan diferencias significativas.

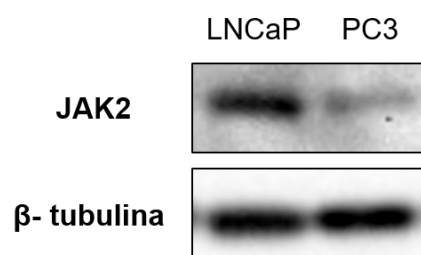


Figura 4.15. Niveles de expresión de JAK2 en las células de carcinoma prostático LNCaP y PC3. Se analizaron los niveles de expresión de JAK2 en las líneas PC3 y LNCaP mediante *Western blot* utilizando como control de carga la β -tubulina.

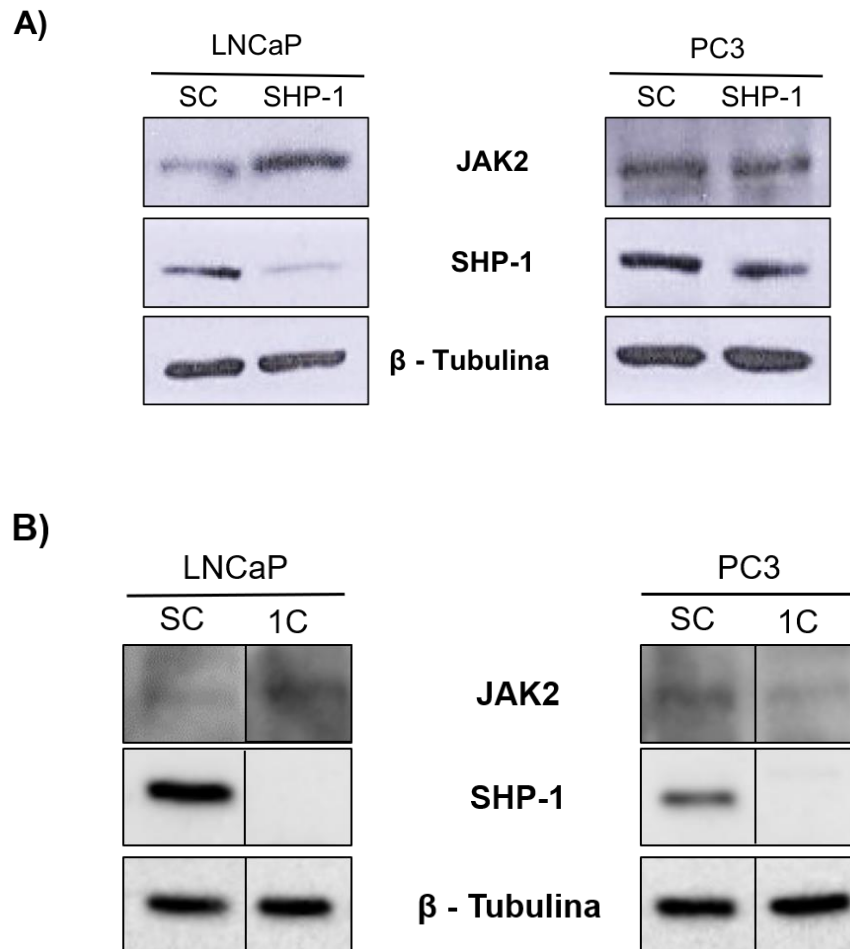


Figura 4.16. Niveles de expresión de JAK2 en células con anulación transitoria de SHP-1. Se analizaron los niveles de JAK2 mediante *Western blot*, (A) en células LNCaP y PC3 en las que se anuló la expresión de SHP-1 mediante siRNA y (B) en células LNCaP y PC3 con anulación estable de SHP-1, utilizando como control de carga β -tubulina.

En otros sistemas celulares, como en el sistema hematopoyético, se ha descrito que SHP-1 regula la fosforilación y actividad de JAK2 mediante su interacción con ella, por lo que a continuación quisimos estudiar si esta interacción también se producía en nuestras líneas celulares²⁷⁶. Para ello, se realizaron ensayos de captura y unión (*pull down*) que permiten detectar las posibles interacciones entre dos o más proteínas *in vitro*. Tal como se describe en materiales y métodos para expresar y purificar SHP-1 utilizamos el vector de expresión pGEX con el cDNA de SHP-1 unido al *tag* de GST (glutación-S-transferasa) que facilita la purificación de la proteína (GST-SHP-1). La figura 4.17 muestra la eficacia del proceso de expresión y purificación de la proteína de fusión GST-SHP-1, con un peso molecular de 90 KDa aproximadamente, y de GST utilizado como control, con un peso molecular de 26 KDa.

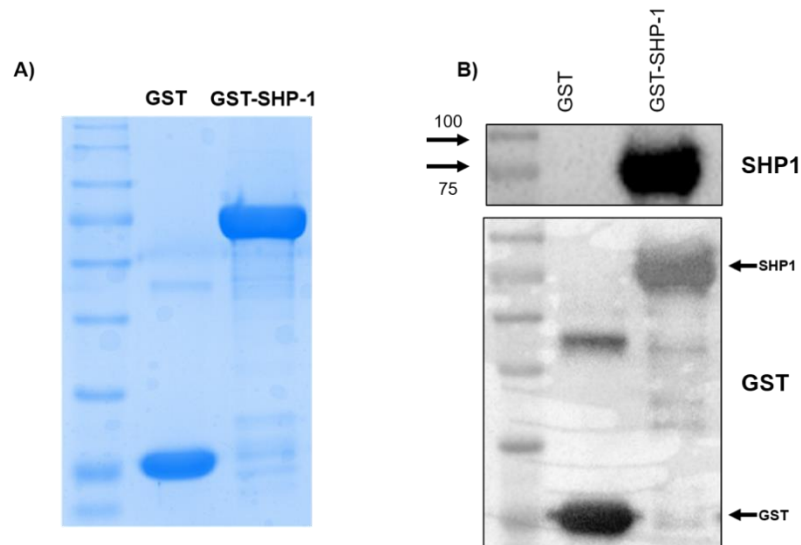
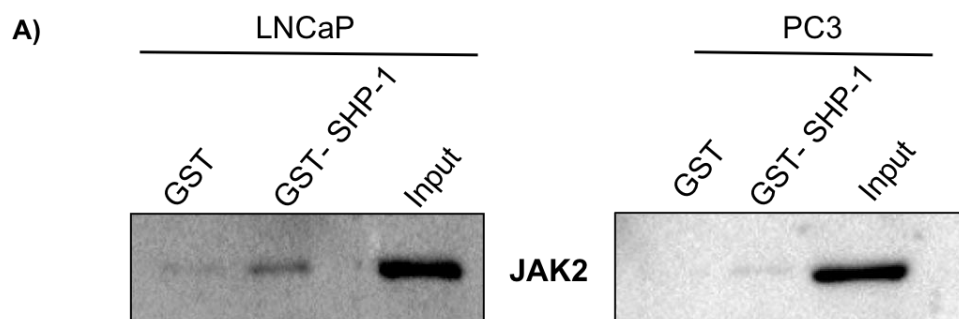


Figura 4.17. SDS-PAGE de la proteína de fusión GST-SHP-1 y GST. (A) Las proteínas purificadas se cargaron en un gel de acrilamida al 12% que se tiñó con Coomassie, lo que nos permite identificar GST y GST-SHP-1. (B) Se realizó *Western blot* con las proteínas purificadas de GST y GST-SHP-1 y se reveló contra SHP-1 (panel superior) y posteriormente contra GST (panel inferior).

Confirmada la eficacia del proceso de expresión y purificación, el siguiente paso fue analizar la interacción entre SHP-1 y JAK2. Con estos ensayos observamos que esta interacción se produce en las dos líneas celulares analizadas, ya que JAK2 solo se detectó en la muestra que se incubó con la proteína de fusión (GST-SHP-1) y no en la que contenía solamente GST (figura 4.18A). Seguidamente, quisimos determinar si esta interacción se producía también *in vivo*, para lo que realizamos una inmunoprecipitación (IP) de JAK2 y detectamos los niveles de SHP-1 mediante *Western Blot*. Tal como muestra la figura 4.18B solo pudimos confirmar esta interacción en las células LNCaP. En células PC3 la ausencia de interacción *in vivo* concordaría con los datos del *pull down* en los que observamos un menor grado de interacción entre estas dos proteínas.



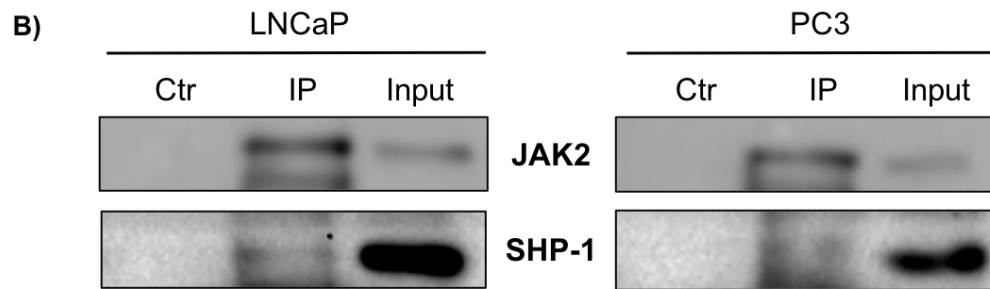


Figura 4.18. Interacción entre SHP-1 y JAK2. (A) Se analizó la interacción *in vitro* entre SHP-1 y JAK2 mediante ensayos de *pull down* en células LNCaP y PC3 utilizando la proteína de fusión GST-SHP-1 (SHP-1) unida a glutatión-sepharosa utilizando como control GST (Ctr), según se encuentra detallado en el apartado de material y métodos. Los complejos formados se analizaron mediante *Western blot*, utilizando un anticuerpo específico anti-JAK2. La imagen muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes. (B) Se analizó la interacción *in vivo* entre SHP-1 y JAK2 en células prostáticas mediante ensayos de inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo específico anti-JAK2. Los complejos formados con las *beads*, los extractos proteicos sin anticuerpo (Ctr), en presencia del anticuerpo (IP) y los *Input* fueron analizados mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos anti-JAK2 y anti-SHP-1. La imagen muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

A continuación, quisimos determinar si existen diferencias en el grado de fosforilación de JAK2 en las células que no expresan SHP-1. Para ello, se inmunoprecipitó JAK2 total y se analizaron los niveles de fosforilación mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo contra su forma fosforilada (p-JAK2). Como muestra la figura 4.19 las células LNCaP que no expresan SHP-1 presentan mayores niveles de p-JAK2.

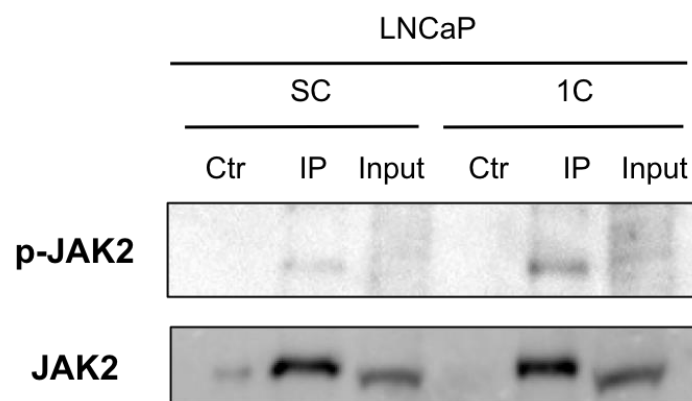


Figura 4.19. Niveles de JAK2 fosforilada en células LNCaP 1C. Se analizaron los niveles de la forma fosforilada de JAK2 en las células tras inmunoprecipitar JAK utilizando un anticuerpo específico anti-JAK2.; los inmunocomplejos obtenidos sin anticuerpo (Ctr), con anticuerpo (IP) y los *inputs* se analizaron mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo específico para la forma fosforilada de JAK2 (p-JAK2).

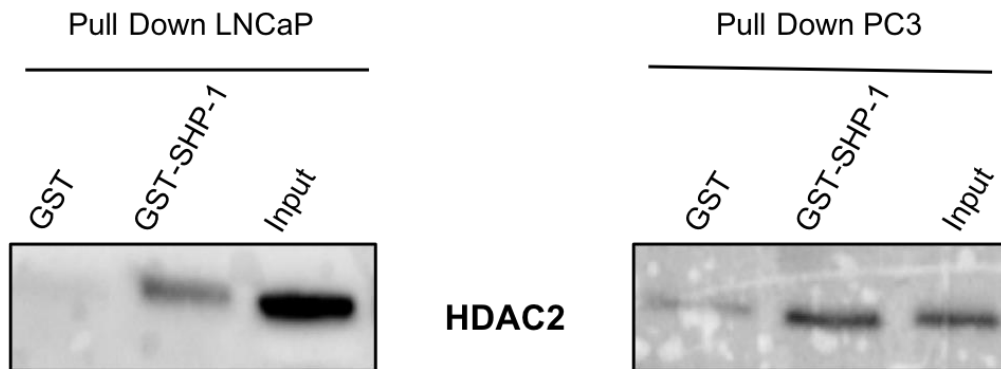
Nuestros resultados demuestran la interacción entre SHP-1 y JAK2 en células LNCaP, además del aumento de la fosforilación de JAK2 cuando se anula esta fosfatasa. Esto parece indicar, que SHP-1 podría regular la actividad de JAK2 al controlar sus niveles de fosforilación en tirosina. Al no disponer de un anticuerpo específico contra la tirosina 41 fosforilada de la histona H3 (H3Y41) en este trabajo hemos analizado la fosforilación total de histonas en residuos en tirosinas, pero lamentablemente, no hemos obtenido resultados concluyentes. Por tanto, no pudimos confirmar que el aumento de actividad de JAK2 sea el responsable del aumento de expresión observado al anular SHP-1.

6. Interacciones de SHP-1 con proteínas epigenéticas

La localización de SHP-1 en el núcleo sugiere la posibilidad de que esta fosfatasa interactúe con proteínas epigenéticas y regule la expresión génica, por lo que el siguiente objetivo fue analizar estas posibles interacciones.

Nuestros datos indican que en ausencia de SHP-1 se producen cambios en la metilación de los promotores de algunos genes, lo que nos llevó a analizar si este efecto podría deberse a una interacción directa con las proteínas encargadas de la metilación del DNA (DNMTs). Dado que todas las modificaciones epigenéticas cooperan, y en concreto que los promotores de genes silenciados se caracterizan por que el DNA está metilado y las histonas desacetiladas, también determinamos las posibles interacciones con proteínas encargadas de la acetilación de histonas, concretamente estudiamos la existencia de posibles interacciones con las HDACs. Para ello, realizamos ensayos de *pull down* utilizando extractos proteicos de las células de cáncer prostático, LNCaP y PC3. Las proteínas retenidas por GST-SHP-1 se detectaron mediante *Western blot* con anticuerpos específicos para las proteínas descritas anteriormente. Los resultados obtenidos muestran que SHP-1 interactúa *in vitro* solo con HDAC2, pero no así con ninguna de las DNMTs, ni con el resto de HDACs analizadas. A continuación, quisimos comprobar si esta interacción realmente se produce *in situ* en las células. Para ello, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación con el anticuerpo de SHP-1 utilizando extractos proteicos de LNCaP y PC3. Los complejos inmunoprecipitados se analizaron mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo específico para HDAC2. Como revela la figura 4.20, en las muestras inmunoprecipitadas se observa la presencia de HDAC2, demostrando una interacción *in situ* entre estas dos proteínas.

A)



B)

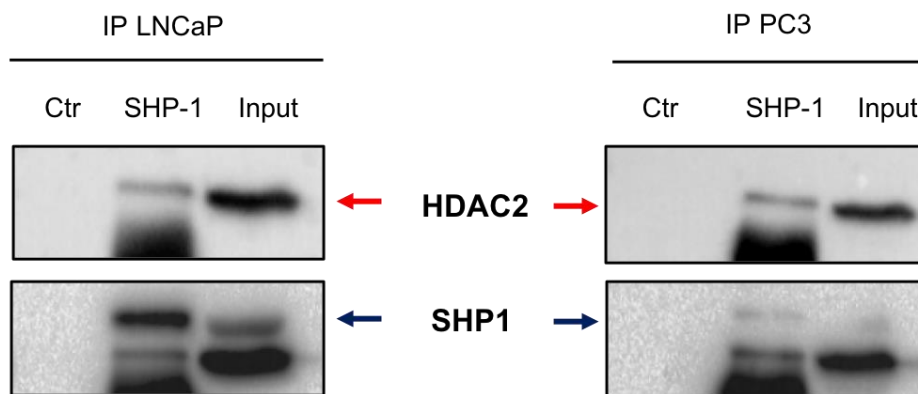
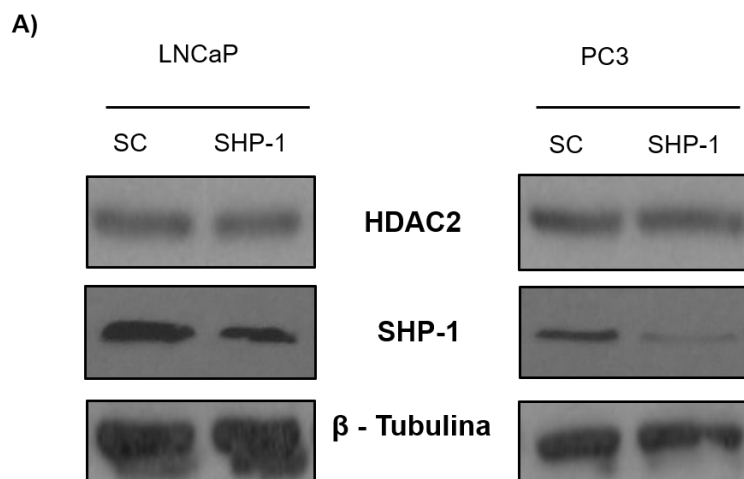


Figura 4.20. Interacción entre SHP-1 y HDAC2. (A) Se analizó la interacción *in vitro* entre SHP-1 y HDAC2 mediante ensayos de *pull down* en células LNCaP y PC3 utilizando la proteína de fusión GST-SHP-1 (SHP-1) unida a glutatión-sepharosa utilizando como control GST (Ctr). Los complejos formados se analizaron mediante *Western blot*, utilizando un anticuerpo específico anti-HDAC2. La imagen muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes. (B) Se analizó la interacción *in vivo* entre SHP-1 y HDAC2 en células prostáticas mediante ensayos de inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo específico anti-SHP-1. Los complejos formados con las *beads*, sin anticuerpo (Ctr), en presencia del anticuerpo (IP) y los *Input* fueron analizados mediante *Western blot* utilizando anticuerpos específicos anti-HDAC2 y anti-SHP-1. La imagen muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Estos datos son los primeros que demuestran una interacción directa de esta fosfatasa con una proteína epigenética. Llegados a este punto, el siguiente paso fue estudiar el efecto de esta interacción sobre la funcionalidad de HDAC2. En primer lugar, nos planteamos que SHP-1 pudiera estar regulando los niveles de HDAC2. Para comprobarlo, se valoraron los niveles de dicha desacetilasa en células en las que se anuló la expresión de SHP-1 y observamos, que los niveles de HDAC2 permanecían constantes independientemente de la presencia de SHP-1 (figura 4.21A).

En segundo lugar, nos preguntamos si SHP-1 estaba influyendo en la localización subcelular de HDAC2, dado que SHP-1 posee una señal de localización nuclear (NLS), y hemos demostrado que en las células LNCaP y PC3 esta fosfatasa se encuentra en el citoplasma y en el núcleo. Por todo esto, determinamos los niveles de HDAC2 en el citosol y el núcleo de las células LNCaP y PC3 en las que se anuló de forma estable la expresión de SHP-1 (1C). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto en primer lugar, que HDAC2 se localiza tanto en el citosol como en el núcleo de los dos tipos celulares, aunque como cabía esperar, los niveles son mayores en el núcleo y, en segundo lugar, que la presencia de HDAC2 en citoplasma y núcleo es independiente de la expresión de SHP-1 (figura 4.21B).

En tercer lugar, debido a que SHP-1 es una proteína tirosina fosfatasa y que HDAC2 se puede fosforilar en residuos de tirosina, nos planteamos que la interacción SHP-1-HDAC2 estuviera relacionada con la acción fosfatasa de la enzima. Para ello intentamos ver la fosforilación de HDAC2 en residuos de tirosina mediante *Western blot* de extractos proteicos, pero no obtuvimos ningún resultado concluyente. Del mismo modo, se hizo una inmunoprecipitación contra HDAC2 para intentar observar residuos fosforilados en tirosina, pero al igual que en ocasiones anteriores no se obtuvieron resultados concluyentes.



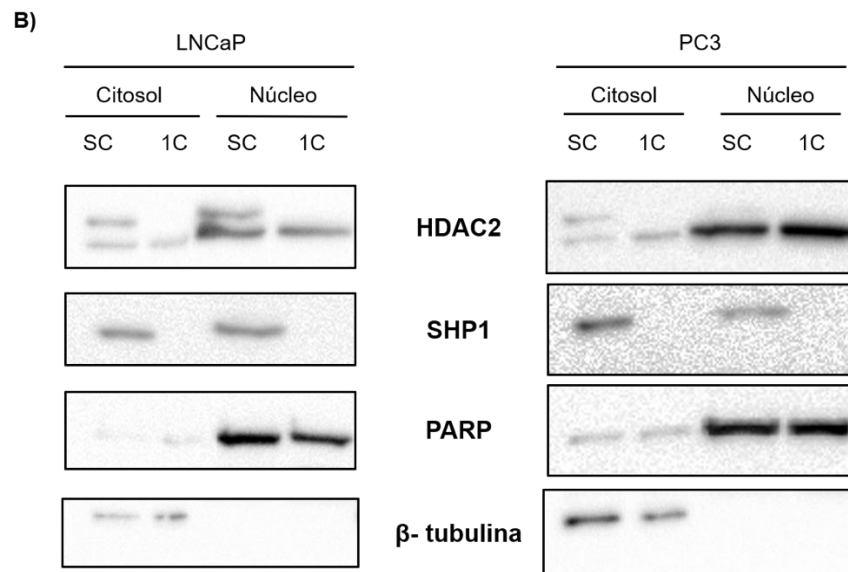


Figura 4.21. Efecto de la interacción entre SHP-1 y HDAC2. A) Se analizaron los niveles de proteína HDAC2 mediante *Western blot* en células LNCaP y PC3 tras anular la expresión de SHP-1 mediante siRNA (SHP-1), utilizando como control de carga β -tubulina. B) Se analizaron los niveles de HDAC2 y SHP-1 en las fracciones subcelulares mediante *Western blot* de LNCaP y PC3 que tienen anulada la expresión de SHP-1 de manera estable. Para ello se utilizó como control citoplasmático la β -tubulina y como control nuclear PARP. La figura se corresponde a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Por último, se analizó si la interacción SHP-1-HDAC2 tenía alguna consecuencia sobre los niveles de acetilación de las histonas. Para ello se aislaron histonas de células LNCaP con anulación transitoria y estable de SHP-1, y mediante *Western blot* se detectó la forma acetilada de la histona H3. Tal como muestra la figura 4.22 observamos mayores niveles de acetilación de la histona H3 en LNCaP cuando se anula SHP-1 tanto de forma transitoria como estable.

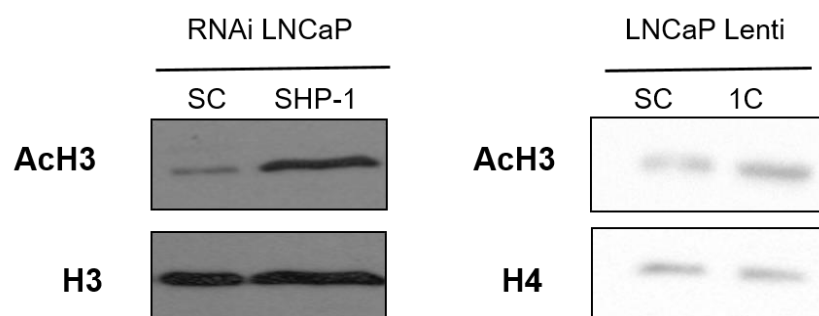


Figura 4.22. Niveles de acetilación globales de las histonas en ausencia de SHP-1. Se evaluaron los niveles de acetilación de la histona H3 en células LNCaP y PC3 con anulación estable de SHP-1 mediante *Western blot*, utilizando como control de carga tanto la H3 como la H4. La figura se corresponde a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

En conjunto nuestros resultados demuestran por primera vez que SHP-1 interacciona con HDAC2 en células de cáncer de próstata. Aunque no hemos podido observar cambios en los niveles, ni en la localización ni en la fosforilación en tirosinas

de esta proteína, si hemos demostrado que la falta de SHP-1 provoca un aumento en los niveles de acetilación globales de la histona H3 en las células LNCaP, lo que nos lleva a pensar que esta interacción podría regular la funcionalidad de HDAC2.

7. Efecto de la anulación de SHP-1 sobre la acetilación de la histona H3

La presencia de SHP-1 en el núcleo celular junto con su interacción con HDAC2, podría ayudar a explicar los cambios en la expresión génica que hemos observado en ausencia de esta proteína. En las células que expresan SHP-1, su interacción con HDAC2 provocaría la desacetilación de las histonas en la región promotora inhibiendo su expresión, mientras que la pérdida de expresión de esta fosfatasa tendría el efecto contrario impidiendo el reclutamiento de HDAC2 a los promotores de estos genes. Esto provocaría un aumento de la acetilación y por tanto de la expresión de los genes seleccionados, que además concordaría con la disminución en la metilación observada en las mismas condiciones. Esto ayudaría a explicar los cambios de expresión de los genes estudiados al anular SHP-1, ya que todas las modificaciones epigenéticas cooperan entre sí para regular la expresión génica, por lo que la disminución de la metilación de los promotores junto con la acetilación de las histonas favorecería la transcripción génica y viceversa.

Por ello quisimos estudiar el estado de acetilación de la histona H3 asociada a los promotores de los genes *RunX1T1*, *Gstp1*, *Kit* y *CEBPD* mediante un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), utilizando un anticuerpo específico para la forma acetilada de la histona H3. Esta técnica permite inmunoprecipitar el DNA que se encuentra asociado a la forma acetilada de la histona H3. El DNA resultante de la inmunoprecipitación se amplifica con *primers* específicos para la región promotora de los genes seleccionados, de modo que la presencia de amplificación en la muestra inmunoprecipitada con el anticuerpo indica que las histonas asociadas a ese promotor están acetiladas, mientras que la ausencia de amplificación indica que están desacetiladas. Como se observa en la figura 4.23, la anulación de SHP-1 aumenta el estado de acetilación de la histona H3 en los promotores de *Gstp1* y *Kit*, por lo que en ausencia de SHP-1 estos genes presentan promotores transcripcionalmente activos, lo que concuerda con el aumento de expresión observado al anular tanto de manera transitoria como estable la expresión de esta proteína (figuras 4.6 y 4.13). Sin embargo, los resultados obtenidos para *RunX1T1* y *CEBPD* no mostraron diferencias en el estado de acetilación de las histonas relacionadas con sus respectivos promotores.

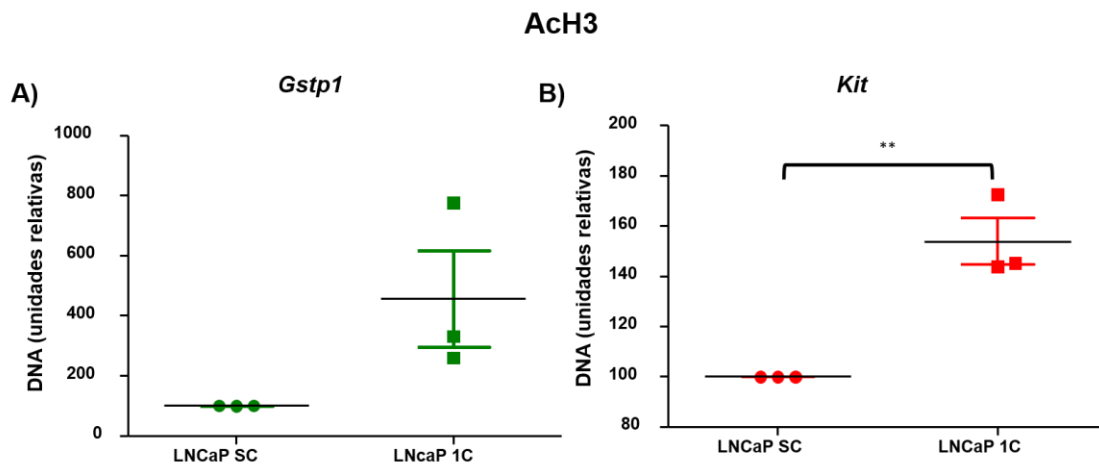


Figura 4.23. Niveles de acetilación de la histona H3 a nivel de los promotores génicos de *Gstp1* y *Kit*. Enriquecimiento relativo de *Gstp1* y *Kit* inmunoprecipitado con anticuerpo contra la acetilación de la H3 en células LNCaP 1C que no expresan SHP-1. Los valores se normalizaron respecto al Input. Cada uno de los puntos representa los datos obtenidos en tres experimentos independientes (** $p < 0,001$ versus SC).

Finalmente, quisimos comprobar que la metilación del DNA y la acetilación de histonas están favoreciendo la expresión de nuestros genes, tratando las células con un inhibidor de las histonas desacetilasas, en concreto SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*) también conocido como Vorinostat, que induce un aumento de la acetilación de las histonas, y por tanto de la expresión génica. Además, se realizó un tratamiento combinado de 5'AZA y SAHA en las células LNCaP, y se determinaron mediante qRT-PCR los niveles de RNAm de los genes *Gstp1* y *Kit*. También aprovechamos estos tratamientos para observar el comportamiento de genes que se habían descartado a lo largo del proceso, particularmente en *CDKN1A* y *RAR β* , que mostraban diferencias de expresión cuando se anulaba SHP-1 pero que no respondían al tratamiento con el agente demetilante 5' AZA.

En la figura 4.24 observamos como aumenta la expresión de los genes al tratar las células con estos compuestos tanto de manera independiente como al combinarlos. De acuerdo con lo demostrado anteriormente, el tratamiento con 5'Aza provoca un aumento de la expresión de cada uno de estos genes, al igual que sucede con el SAHA, cuyo efecto en solitario es mayor sobre la expresión de *Kit* que el observado en *Gstp1*. Por otro lado, el tratamiento combinado de Aza + SAHA en *Kit* produce un aumento de expresión mayor al del tratamiento de manera independiente, lo que sugiere un efecto sinérgico de ambos compuestos, mientras que el impacto sobre la expresión de *Gstp1* es muy similar al obtenido al tratar las células con 5'Aza. Finalmente, los resultados obtenidos en la expresión de *CDKN1A* y *RAR β* no muestra diferencias cuando se tratan con el SAHA, lo que indica que los cambios de expresión

observados en ausencia de SHP-1 se deben a otros mecanismos que no están relacionados con la epigenética (datos no mostrados).

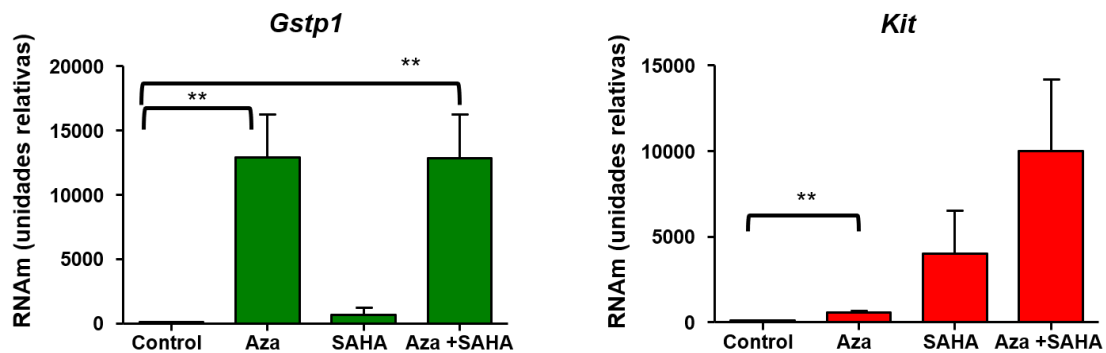


Figura 4.24. Niveles de expresión de *Kit* y *Gstp1* tras el tratamiento con los agentes epigenéticos 5'AZA y SAHA en células LNCaP. Se analizaron los niveles de expresión de los genes *Gstp1* y *Kit* en células LNCaP tratadas con los compuestos epigenéticos 5'-Aza y SAHA mediante qRT-PCR utilizando como gen endógeno *Gapdh*. Se muestra un experimento representativo. Los niveles de expresión se normalizaron con respecto a *Gapdh*. Los datos mostrados proceden de cuatro experimentos independientes. (** $p < 0,001$; *** $p < 0,001$ versus SC).

Estos datos nos permiten afirmar que la pérdida de SHP-1 en las células LNCaP provoca un aumento de expresión de los genes *Kit* y *Gstp1* que se debe, al menos en parte, a un aumento de la acetilación de la histona H3 y que se ve confirmada por el aumento de expresión al tratar las células con el inhibidor de HDACs SAHA. Esto junto con la interacción que se produce entre SHP-1 y HDAC2 parece indicar que la pérdida de expresión de SHP-1 impide el reclutamiento de HDAC2 a los promotores de estos genes, provocando un aumento de la acetilación de las histonas en esta región y un aumento de su expresión.

8. Caracterización del fenotipo de las líneas de cáncer de próstata con anulación estable de SHP-1

SHP-1 se expresa fundamentalmente en tejido hematopoyético, donde regula negativamente vías que promueven el crecimiento, la supervivencia y la adhesión celular⁶⁸. También se ha descrito su expresión en células epiteliales, así en las células de carcinoma hepatocelular (HCC) la ausencia de SHP-1 aumenta la migración y la invasión celular regulando la transición epitelio-mesénquima (EMT)⁷². Esto sumado a los resultados expuestos hasta el momento, que indican que SHP-1 regula la expresión de genes con importantes papeles en los diferentes procesos celulares necesarios para el mantenimiento de la homeostasis celular en células de cáncer de próstata, nos llevó a estudiar si los cambios en la expresión génica provocados por la anulación de SHP-1, modificaban algunos de los principales procesos responsables

de la progresión tumoral como son la proliferación, la adhesión, la migración y la invasión celular.

8.1 Modificación de la proliferación celular en ausencia de SHP-1

En primer lugar, se determinó el efecto de la anulación de SHP-1 sobre la proliferación de las células LNCaP en distintas condiciones de cultivo. Para ello, comparamos la proliferación de las células que no expresan SHP-1 con su control creciendo las células en ausencia de suero durante 2, 4 y 6 días.

El análisis de los resultados muestra que, en ausencia de suero, las células LNCaP SC dejan de proliferar a partir de los dos días, llegando a disminuir a partir de los 4 días; las LNCaP 1C, aunque presentan una cinética de proliferación similar a la de las células control, presentan una mayor proliferación a todos los tiempos analizados (figura 4.25A). Paralelamente, determinamos el efecto de anular SHP-1 sobre la proliferación celular en presencia de concentraciones crecientes de DHT (0 , 10^{-11} , 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} y 10^{-7} M) durante 4 días. Como muestra la figura 4.25B, la DHT estimula la proliferación de las células control a todas las concentraciones analizadas, sin embargo, en ausencia de SHP-1, aunque la DHT continúa estimulando la proliferación celular, la tasa de proliferación es menor. En concreto, a una concentración de DHT de 10^{-8} M las células que no expresan SHP-1 aumentan su proliferación un 21%, mientras que las que si la expresan lo aumentan un 68%.

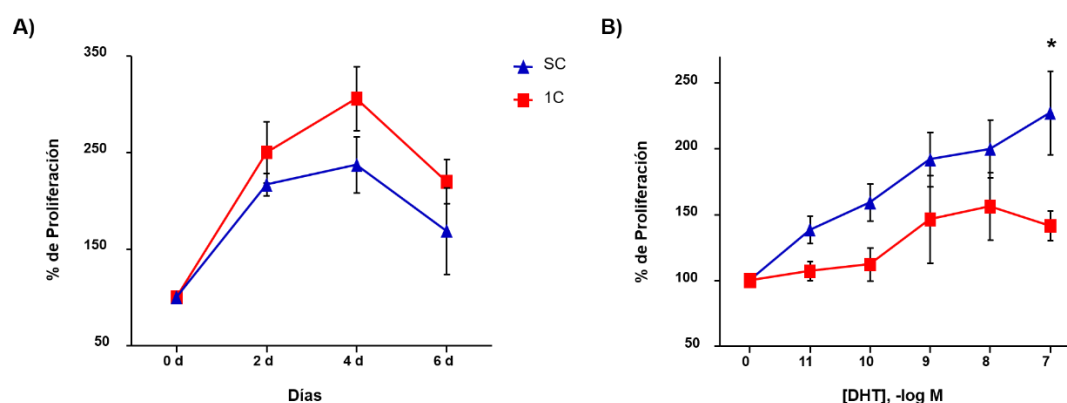


Figura 4.25. Efecto de la anulación de SHP-1 en la proliferación celular en respuesta a un tratamiento con DHT. (A) Se sembraron células LNCaP SC y 1C a la misma densidad, pasadas 48 horas se sustituye el medio completo por un medio sin suero (0%), y se analizó la proliferación mediante MTT, a los 0, 2, 4 y 6 días. Los resultados son medias \pm SEM de cinco experimentos independientes. (B) Las células LNCaP SC y 1C que habían estado en medio sin suero se trataron con diferentes concentraciones de DHT durante 4 días y seguidamente se midió la proliferación mediante MTT. Los resultados son medias \pm SEM de cuatro experimentos independientes.

A la vista de estos resultados, nos planteamos estudiar, en las condiciones analizadas, la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular

mediante ensayos de citometría de flujo. Nuestros resultados indican que, en presencia de suero, la falta de SHP-1 no modifica de forma significativa la distribución de las células en las distintas fases del ciclo. Sin embargo, en ausencia de suero, la eliminación de SHP-1 provoca una disminución del número de células en la fase G_0/G_1 y un aumento en las fases S y G_2/M , respecto al control (figura 4.26).

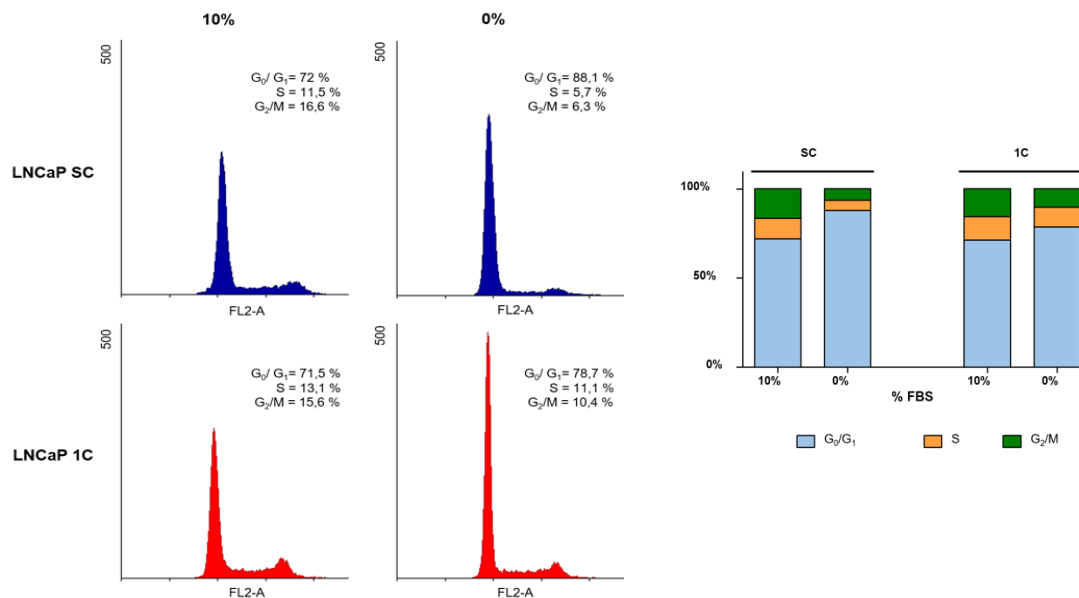


Figura 4.26. Efecto de la anulación de SHP-1 en las células LNCaP sobre el ciclo celular. Se sembraron células LNCaP SC y 1C a la misma densidad, pasadas 48 horas se sustituye el medio completo por un medio sin suero (0%). A los 4 días, se analizó la distribución de las células en las distintas fases del ciclo mediante citometría de flujo. Se muestran los perfiles de citometría y un gráfico en el que se representan los porcentajes de las distintas fases del ciclo. Los datos se corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

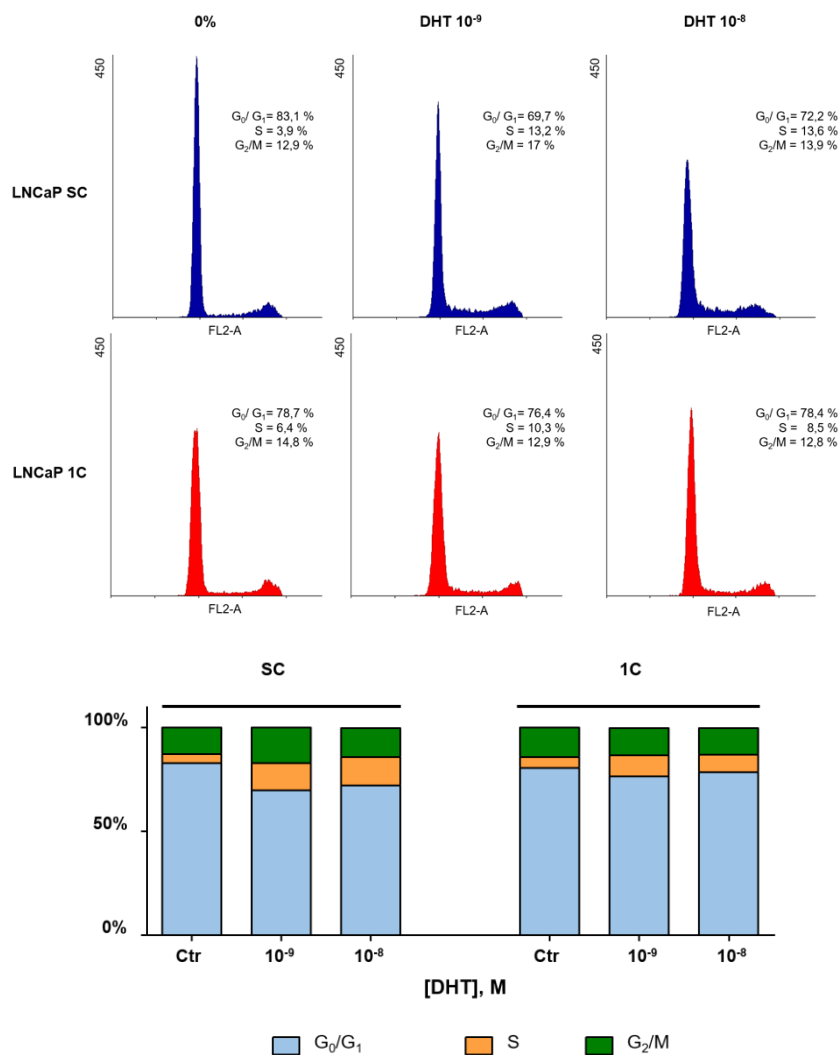


Figura 4.27. Efecto de la anulación de SHP-1 en células LNCaP tratadas con DHT sobre el ciclo celular. Se sembraron células LNCaP SC y 1C a la misma densidad. A las 48 horas se sustituye el medio completo por un medio sin suero (0%) y las células se trataron con concentraciones de DHT de 10⁻⁹ y 10⁻⁸ M durante 4 días; seguidamente se analizó la distribución de las células en las distintas fases del ciclo mediante citometría de flujo. Se muestran los perfiles de citometría y un gráfico en el que se representan los porcentajes de las distintas fases del ciclo. Los datos se corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

Al igual que hicimos con los ensayos de proliferación celular, también analizamos el ciclo celular en presencia de DHT (concentraciones 10⁻⁹ y 10⁻⁸ M). Tal como se observa en la figura 4.27 las células LNCaP SC responden mejor al tratamiento con DHT revirtiendo la parada del ciclo producida por la eliminación del suero, ya que disminuyen el número de células en fase G₀/G₁ y aumenta la cantidad de células en fases S y G₂/M. Sin embargo, las células LNCaP 1C no muestran grandes variaciones en las fases del ciclo al ser tratadas con DHT.

En conjunto, estos resultados indican que las células que no expresan SHP-1 tienen un comportamiento parecido al de las células de cáncer de próstata que no

responden al tratamiento hormonal y son capaces de crecer en ausencia de andrógenos, ya que su tasa de proliferación es mayor en ausencia de suero y por tanto su respuesta a andrógenos es menor. Una característica de este tipo de tumores es que AR se activa por vías de transducción de señales independientes de su ligando natural. En concreto, se ha demostrado que el AR en ausencia de andrógenos puede activarse por el factor de crecimiento epidérmico (EGF)²⁷⁷, a través de fosforilaciones de distintos residuos de tirosinas desencadenando una proliferación celular excesiva. EGF es uno de los factores mitógenos más importantes en la regulación de la función normal de la próstata. Además, diferentes estudios han reconocido la implicación de SHP-1 en las vías de señalización del EGF²⁷⁸. Por esto, quisimos analizar el efecto de anular SHP-1 sobre la distribución en las distintas fases del ciclo celular de las células LNCaP tratadas con EGF. Para ello, estas células, que habían estado creciendo previamente en medio sin suero, se trataron durante dos días con una concentración de EGF de 10^{-8} M. Los resultados mostrados en la figura 4.28 indican que las células LNCaP 1C responden mejor que las LNCaP SC al tratamiento con EGF aumentando la actividad de su ciclo celular.

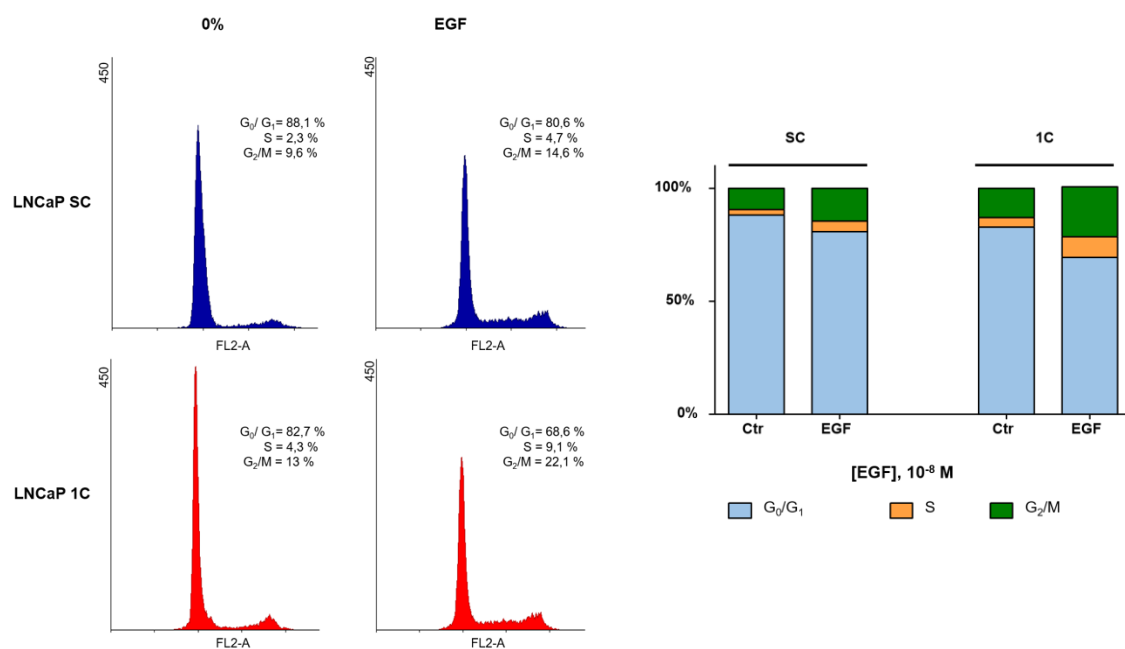


Figura 4.28. Efecto de la anulación de SHP-1 en células LNCaP sobre el ciclo celular tras el tratamiento con EGF. Se sembraron células LNCaP SC y 1C a la misma densidad. A las 48 horas se sustituye el medio completo por un medio sin suero (0%) y las células se trataron con 10^{-8} M de EGF durante 2 días; seguidamente se analizó la distribución de las células en las distintas fases del ciclo mediante citometría de flujo. Se muestran los perfiles de citometría y un gráfico en el que se representan los porcentajes de las distintas fases del ciclo. Los datos se corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes.

A la vista de estos resultados podemos sugerir que la anulación de SHP-1 en células LNCaP las hace más resistentes a la ablación androgénica, ya que son capaces de continuar proliferando al mantener su ciclo celular activo en estas condiciones. Además de hacerlas más sensibles al tratamiento con EGF.

8.2 Cambios en el fenotipo migratorio e invasivo en ausencia de SHP-1

En primer lugar, evaluamos el efecto de SHP-1 sobre la capacidad migratoria de las células LNCaP mediante los ensayos de migración. Como se observa en la figura 4.29 la ausencia de SHP-1 provoca un aumento significativo de la migración de alrededor de un 68%.

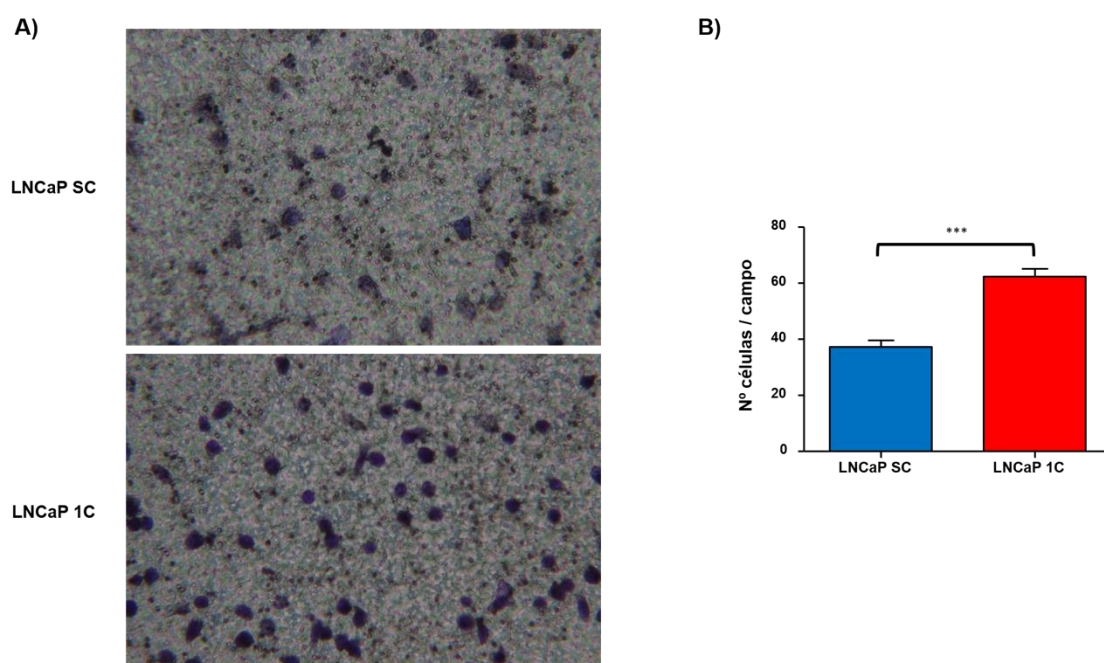


Figura 4.29. Efecto de la falta de expresión de SHP-1 sobre la migración de las células LNCaP. Se realizaron ensayos de migración en *transwells* utilizando fibronectina como matriz extracelular, las células se tiñeron y se fotografiaron al menos 3 campos aleatorios en cada ensayo. (A) Se muestra un campo representativo de migraciones en las células LNCaP SC y 1C. (B) Representación gráfica del número de células que han migrado por campo. Se representan valores promedios \pm DEM de tres experimentos independientes (** $p < 0,001$ versus SC).

Para migrar, las células tienen que ser capaces primero de adherirse a los componentes de la matriz extracelular, por lo que a continuación, quisimos estudiar el efecto de la pérdida de expresión de SHP-1 sobre la capacidad de adhesión de las células LNCaP. Para ello, se sembraron células en placas cubiertas de fibronectina y se midió la cantidad de células adheridas a diferentes tiempos (30, 60 y 90 minutos). En la figura 4.30 se puede observar que la cinética de adhesión de las células LNCaP con o sin SHP-1 discurren paralelas aumentando el número de células adheridas en

función del tiempo. Sin embargo, el número de células 1C es mayor respecto al control, a todos los tiempos estudiados.

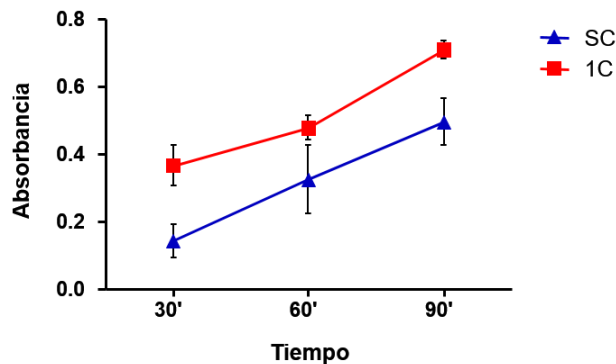


Figura 4.30. Efecto de la anulación de SHP-1 sobre la adhesión de las células LNCaP. Se analizó la adhesión a fibronectina de células LNCaP SC y 1C a los tiempos indicados de acuerdo con lo expuesto en materiales y métodos; las células adheridas se cuantificaron mediante MTT. Los datos representados son medias \pm SEM de cinco experimentos independientes.

Además de la migración y la adhesión, la invasión es otro de los principales procesos cruciales en los procesos metastásicos, y por lo tanto en la progresión tumoral. Por consiguiente, el siguiente paso fue analizar la capacidad invasiva de las células LNCaP 1C. Como muestra la figura 4.31, la anulación de SHP-1 provocó un aumento de la capacidad invasiva de las células LNCaP 1C a través de membranas porosas de policarbonato recubiertas de matrigel.

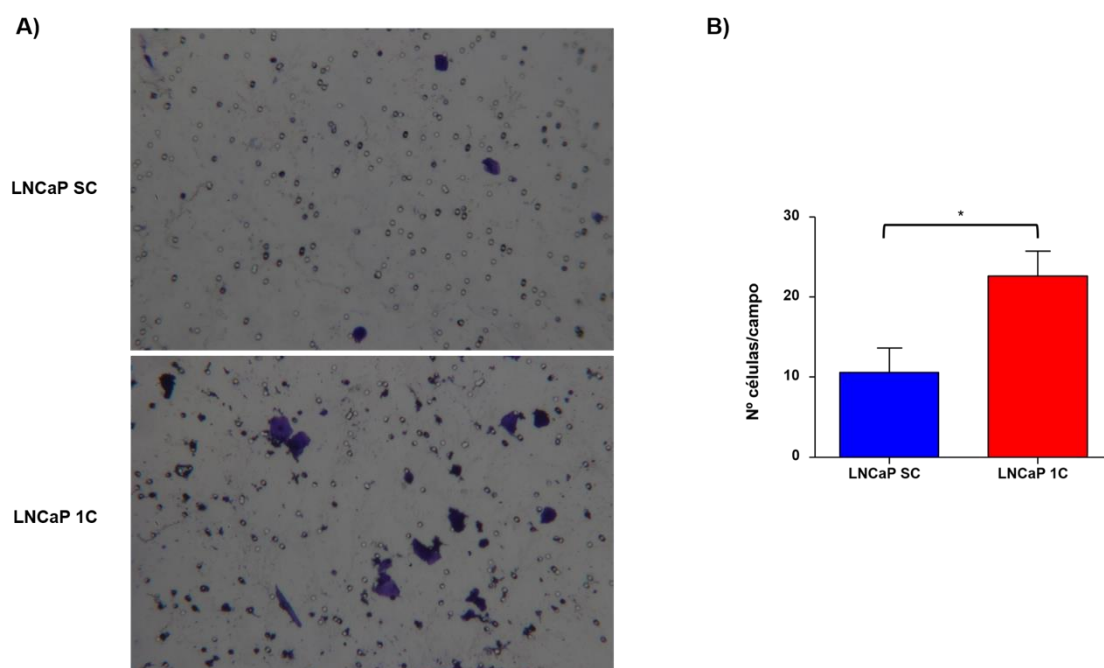


Figura 4.31. Efecto de la anulación estable de SHP-1 sobre la invasión en células LNCaP. Se

realizaron ensayos de invasión en *transwell* utilizando como matriz extracelular matrigel, las células se tiñeron y se fotografiaron al menos 3 campos aleatorios en cada ensayo. (A) Se muestra un campo representativo de invasión de las células LNCaP SC y 1C. (B) Representación gráfica del número de células que han invadido por campo. Se representan valores promedios \pm DEM de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$ versus SC).

Con estos datos podemos inferir que la ausencia de SHP-1 en células LNCaP promueve la progresión tumoral, ya que se ve incrementada su capacidad migratoria e invasora, además de la capacidad de adherirse al sustrato.

Discusión

El cáncer, una de las primeras causas de muerte a nivel mundial, se desarrolla por un gran número de alteraciones genéticas y epigenéticas, que conducen en último término a una desregulación de los mecanismos que controlan el comportamiento normal de las células de nuestro organismo. Por lo que conocer las alteraciones que se producen en cada tipo de cáncer para encontrar biomarcadores, y terapias efectivas para el tratamiento personalizado se ha convertido en uno de los mayores retos de la ciencia en nuestros días.

En los procesos de señalización, las células responden a estímulos externos mediante complejas vías de transducción de señales que, en último término, controlan la expresión génica. Las modificaciones epigenéticas juegan un papel clave en la regulación de la expresión, por lo que debe existir una estrecha relación entre las vías de transducción y las modificaciones epigenéticas, dos procesos que han demostrado, además, estar frecuentemente alterados en cáncer. En este sentido, Kwon *et al.* describieron en 2010 que K-Ras favorece procesos metastásicos en cáncer de próstata mediante la formación de un complejo formado por la DNMT3b y HDAC1 que reprimen la expresión de E-Cadherina²⁷⁹. Otro estudio más reciente ha demostrado que el tratamiento con IL-6 reduce los niveles de la DNMT1 y DNMT3b provocando una hipometilación del DNA y un aumento de la expresión de genes implicados en la respuesta a insulina y en la angiogénesis²⁸⁰.

En este trabajo hemos estudiado si la tirosina fosfatasa SHP-1 podría estar regulando la expresión génica en cáncer de próstata mediante el control de las modificaciones epigenéticas. Varias razones nos han hecho plantearnos esta hipótesis: en primer lugar, nuestro grupo ha sido pionero en demostrar la presencia de esta fosfatasa en la próstata normal y patológica; en segundo lugar, se localiza en el núcleo de células cancerígenas prostáticas; por último, la anulación de SHP-1 en este tipo celular modifica la expresión de reguladores del ciclo celular como p27 y ciclina E, lo que provoca parada del ciclo celular⁵⁷. Además, existen estudios que indican que la fosforilación de histonas por tirosinas quinasas modifica la expresión génica. En concreto, se ha demostrado que la tirosina quinasa JAK2 fosforila la tirosina 41 de la histona H3 (H3Y41P) favoreciendo que la cromatina adquiriera una conformación más relajada al liberarse la proteína de heterocromatina HP1 α , permitiendo así la transcripción^{281,282}. Del mismo modo, la proteína tirosina quinasa ACK1 fosforila la tirosina 88 de la histona H4 (H4Y88P) en células de cáncer de próstata induciendo la

transcripción del AR y favoreciendo la progresión de la enfermedad a CRPC²⁵⁵. Además, la actividad de las proteínas reguladoras de las modificaciones epigenéticas también se regula por fosforilación, Gonzalez-Zuñiga *et al.* demostraron en 2014 que la tirosina quinasa c-Abl prevenía la degradación proteosomal de HDAC2 e incrementaba su actividad represora mediante la fosforilación en residuos de tirosina¹⁵⁶. Por ello, en este trabajo nos planteamos analizar si SHP-1 actúa como un regulador de la expresión génica mediante cambios en las modificaciones epigenéticas y determinar el mecanismo molecular por el que ejerce este efecto.

1. SHP-1 regula la expresión génica mediante cambios en la metilación del DNA

Para abordar el estudio del posible papel de SHP-1 como regulador de las modificaciones epigenéticas podíamos utilizar dos ensayos: ensayos de ChIP-seq y los *arrays* de metilación del DNA. Los ensayos de ChIP-seq permiten determinar cambios globales en las modificaciones de histonas, pero dado que no tenemos información previa sobre si existe interacción directa de SHP-1 con las histonas ni con proteínas reguladoras epigenéticas, no podemos acotar el ensayo, obligándonos a estudiar todas las modificaciones de histonas conocidas. Sin embargo, con los *arrays* de metilación se determinan cambios en una única modificación, lo que es una información muy valiosa porque nos permite conocer si se relaciona con cambios en la expresión, y dado que todas las modificaciones epigenéticas cooperan en la regulación de la expresión génica, posteriormente determinar los cambios de las modificaciones de histonas que los acompañan. Además, otra razón para elegir esta técnica fue el hecho de que la metilación del DNA es una de las alteraciones epigenéticas mejor conocidas en cáncer de próstata, y que se presenta en etapas muy tempranas del desarrollo de la enfermedad²¹⁸.

Los avances tecnológicos de las últimas décadas han permitido desarrollar herramientas que facilitan el estudio de la metilación de manera sistemática y con una gran resolución. Los *arrays* de metilación han conseguido reducir los costes, facilitar el análisis y hacer este tipo de estudios aptos en los diferentes contextos experimentales, ya sea para un uso clínico o en investigación básica. La primera plataforma de metilación, *GoldenGate*, permitía cuantificar 1.505 CpGs de la región promotora de genes implicados en procesos relacionados con el desarrollo del cáncer. En nuestro estudio utilizamos esta plataforma como una primera aproximación para determinar si la pérdida de expresión de SHP-1 provoca cambios en la metilación del DNA. El desarrollo de nuevas plataformas, que permitían ampliar el estudio a un mayor número

de CpGs distribuidas en regiones del genoma con diferente funcionalidad manteniendo la sensibilidad y reproducibilidad, (*Infinium450K*) nos permitió abordar de manera global el estudio del perfil de metilación de líneas celulares de cáncer de próstata con inhibición de SHP-1.

Si bien es cierto que no esperábamos encontrar diferencias a nivel global, y menos aun teniendo en cuenta que las muestras provenían de una inhibición transitoria de SHP-1, nos sorprendieron los resultados obtenidos con la plataforma *GoldenGate* ya que, en primer lugar, no encontramos cambios en la metilación en las células PC3, y en segundo, todos los encontrados en LNCaP correspondían a una disminución de los niveles de metilación. Sin embargo, los datos obtenidos con la plataforma *Infinium450K* mostraron cambios en el patrón de metilación en ambas líneas celulares y en ambos sentidos, aumento y disminución. Esto puede deberse a que la plataforma *GoldenGate* analiza un número muy limitado de CpGs, todas ellas en la región promotora de 807 genes, mientras que la plataforma *Infinium450K* nos aporta información de 450.000 CpGs distribuidas a lo largo de todo el genoma.

El análisis de ontología génica de los datos obtenidos con las dos plataformas de metilación nos proporcionó información sobre las vías de señalización y los procesos celulares afectados por cambios de metilación al anular SHP-1. Esto nos ha permitido seleccionar un grupo de genes cuyos cambios de expresión podrían tener un papel relevante en cáncer y nos ayudaría a entender la relevancia funcional de SHP-1 en cáncer de próstata.

En concreto, en este trabajo hemos demostrado que la anulación de SHP-1 en las células LNCaP, modifica la expresión de genes importantes para su correcto funcionamiento. Por un lado, se observa el aumento de la expresión de los genes *RunX1T1*, *Gstp1* y *Kit*, que se debe, al menos en parte, a una disminución de la metilación del DNA, ya que el tratamiento de las células LNCaP control con un agente demetilante provoca la reexpresión de estos genes, y sus niveles de expresión son más elevados en la línea celular PC3 en la que no está metilado. Por el contrario, la anulación de SHP-1 provoca la pérdida de expresión de *CEBPD* coincidiendo con un aumento de los niveles de metilación de su región promotora.

Sin embargo, no todos los datos de metilación obtenidos en los *arrays* pudieron ser confirmados completamente mediante secuenciación del DNA tratado con bisulfito. Esto podría deberse a la presencia de 5-hidroxi-metilcitosina, un intermediario en el proceso de demetilación activa que se relaciona con promotores transcripcionalmente

activos pero que es resistente al tratamiento con bisulfito. Este dato unido a que no hemos podido demostrar que esta fosfatasa tenga algún efecto sobre la actividad o expresión de las DNMTs nos llevó a pensar que la demetilación del DNA inducida por la falta de SHP-1 debe ser activa. La demetilación activa está catalizada por las TET; una de las cuales, TET2, es fosforilada en residuos tirosina y activada por la quinasa JAK2²⁸³. Nuestros resultados muestran que SHP-1 interacciona con JAK2 regulando su fosforilación y por lo tanto su actividad. Esto parece indicar que la demetilación del DNA inducida por la falta de SHP-1 podría deberse a la activación de TET2 por JAK2, aunque no se puede descartar que sea directamente SHP-1 la que inactive a TET2 defosforilándola.

Nuestro trabajo muestra por primera vez el papel de SHP-1 en la regulación de la expresión de genes que pueden estar implicados en la progresión tumoral. Por un lado, *RunX1T1* es un represor transcripcional que recluta complejos represores que contienen HDACs^{284,285} y DNMTs²⁸⁶, y regula funciones tan importantes como el ciclo celular y la leucemogénesis²⁸⁷. En cuanto a su papel en cáncer, *RunX1T1* está considerado tanto un oncogén como un gen supresor de tumores dependiendo de las moléculas que lo acompañen. En nuestro caso, encontramos que *RunX1T1* está metilado en las células LNCaP, mientras que se demetila y aumenta su expresión en células que expresan bajos niveles de SHP-1, (LNCaP SHP-1 y PC3) coincidiendo con un aumento de la proliferación celular. Estos datos sugieren que *RunX1T1* está favoreciendo la progresión tumoral, más que el inicio de la enfermedad. Se ha demostrado que en leucemia mieloide aguda (AML) posee un papel oncogénico, aunque no induce la enfermedad, sino que ayuda a crear un ambiente adecuado para que se desarrolle, debido a que detiene las células en etapas inmaduras del desarrollo²⁸⁸⁻²⁹². Además, La expresión de *RunX1T1* está aumentada, junto con otros oncogenes, en un modelo de carcinoma de células escamosas del pene²⁹³. Sin embargo, también puede actuar como un gen supresor de tumores; en cáncer de ovario, donde pierde la expresión por metilación, y su reexpresión inhibe el crecimiento de las células tumorales²⁹⁴, al igual que sucede en cáncer colorrectal donde además de inhibir la proliferación celular, sensibiliza a las células a los tratamientos quimioterápicos²⁸⁷.

Por otro lado, *Gstp1* codifica para la glutatión-S-transferasa π 1, una enzima implicada en procesos de detoxificación de compuestos electrofílicos, incluidos carcinógenos y fármacos, por conjugación con glutatión, además de proteger al DNA de los daños provocados por el estrés oxidativo²¹³. Es uno de los marcadores

epigenéticos mejor establecidos y estudiados en cáncer de próstata, ya que se encuentra metilado en más del 90% de los tumores de próstata y en lesiones premalignas, pero no en tejidos normales²⁹⁵. El silenciamiento epigenético de *Gstp1* se considera un evento temprano en la progresión de la patología, y algunos estudios también lo asocian con el riesgo de recurrencia²⁹⁶, lo que indica que *Gstp1* posee un papel protector en el desarrollo del cáncer de próstata al evitar el daño del DNA y la citotoxicidad de algunos cancerígenos²⁹⁷. En consonancia con estos estudios, nuestros datos muestran que *Gstp1* está metilado en las células LNCaP, que representan un estadio temprano en el desarrollo de la enfermedad y responden al tratamiento hormonal. Pero sorprendentemente, la anulación de SHP-1 provoca un aumento en la expresión de *Gstp1* coincidiendo con un aumento en la proliferación y una menor respuesta a DHT, características propias del cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC), forma más agresiva de la enfermedad y que no responde a los tratamientos hormonales. Estos datos inducen a pensar que quizá el silenciamiento de *Gstp1* es necesario para el inicio del cáncer de próstata, pero no para la progresión a estadios más avanzados de la enfermedad, donde podría proteger a las células tumorales frente las diferentes terapias. En este sentido, hay estudios que demuestran un aumento en los niveles de *Gstp1* en tumores más agresivos, con peor pronóstico y resistentes a los agentes quimioterápicos²⁹⁸, relacionándose el aumento de la actividad detoxificadora con una mayor resistencia de las células cancerígenas a los diferentes fármacos empleados en el tratamiento²⁹⁹. Incluso hay estudios que sugieren que *Gstp1* induce resistencia a la radioterapia al reducir las especies reactivas del oxígeno (ROS) que provocan daños en el DNA³⁰⁰.

Otro de los genes seleccionados fue *Kit*, que codifica para un receptor tirosina quinasa, cuyo ligando natural es SCF (*stem cell factor*). En tejidos normales se ha demostrado su implicación en funciones tales como la fertilidad, la homeostasis y la melanogénesis, además de, en proliferación, supervivencia, migración y diferenciación celular. En cáncer puede tener un papel dual como oncogén y como gen supresor de tumores; en cuanto a su papel oncogénico se ha observado un aumento de la función de *Kit* en tumores gastrointestinales (GIST) y cáncer colorrectal, además de en tumores resistentes a la quimioterapia^{301,302}; sin embargo, también se ha demostrado que actúa como un supresor tumoral en otros tipos de cáncer como el de tiroides y melanoma metastásico, en donde se ha asociado la metilación de *Kit* con el desarrollo del cáncer de mama³⁰³. Distintos autores han encontrado una relación directa entre SHP-1 y *Kit*. SHP-1 defosforila y disminuye la actividad de *Kit* inhibiendo, así, su efecto proliferativo en células hematopoyéticas (HSC) ^{304,305}. En condiciones patológicas el

mutante de *Kit* D816V no es regulado por SHP-1 provocando una proliferación descontrolada y la transformación oncogénica³⁰⁶. En células de leucemia aguda se ha encontrado una relación inversa entre los niveles de metilación y expresión de SHP-1 con los de expresión de *Kit*, lo que indica que en ausencia de SHP-1 se debilita la regulación de *Kit* favoreciéndose así la proliferación descontrolada causante de la leucemia³⁰⁷. Esto se relaciona perfectamente con los datos obtenidos en nuestro estudio, donde las células LNCaP que tienen anulada la expresión de SHP-1 presentan mayor expresión de *Kit* y una mayor tasa de proliferación, adhesión, migración e invasión.

Por último, *CEBPD*, es un gen que codifica para un factor de transcripción (*CCAAT/enhancer-binding protein delta*) implicado en la diferenciación celular, el metabolismo, la proliferación y en la respuesta a estímulos inflamatorios^{308,309}. En cáncer, su papel depende del tejido; en tumores uroteliales parece tener un papel oncogénico, mientras que en leucemia, cáncer de hígado y cervical el gen de *CEBPD* está silenciado por hipermetilación de su promotor³¹⁰, y se le considera un gen supresor de tumores al igual que en cáncer de próstata, donde la mayoría de estudios indican que *CEBPD* inhibe el crecimiento tumoral³¹¹ e induce apoptosis^{312,313}. En consonancia con estos estudios, nuestros datos muestran que la disminución de *CEBPD*, provocada por la anulación de SHP-1, coincide con un aumento de la proliferación.

Por otro lado, se ha demostrado que los andrógenos estimulan la transcripción de *CEBPD* al unirse el AR directamente a su promotor. De hecho, un estudio indica que en células LNCaP insensibles a andrógenos (LNCaP 104-R1) se pierde la expresión de *CEBPD*, y el tratamiento con el agente demetilante 5'-Aza no conseguía revertir su expresión; sin embargo, si se conseguía este efecto al tratar las células con un inhibidor de la histona metiltransferasa EZH2 y este efecto se incrementaba cuando además trataban las células con DHT³¹⁴, lo que indica que la expresión de este gen está regulada por el receptor de andrógenos y EZH2. En este sentido, en nuestro estudio hemos identificado un aumento de la metilación de *CEBPD* al anular SHP-1 (células LNCaP 1C), pero al igual que en el trabajo de Chuang *et al.*³¹⁴ no conseguimos revertir el patrón de metilación al tratar con el 5'-Aza, lo que podría indicar, al igual que en su estudio, que la falta de expresión de *CEBPD* en ausencia de SHP-1 podría deberse a la acción de EZH2. Además, en este trabajo hemos demostrado que el fenotipo de las células LNCaP 1C, donde *CEBPD* no se expresa, recuerda al de las células de cáncer de próstata que han perdido la sensibilidad a andrógenos y no

responden a los tratamientos hormonales. Tomados en conjunto, estos datos apuntan a un posible papel de SHP-1 en la progresión de los tumores de próstata mediante la regulación de la expresión de *CEBPD*.

Además, no debemos perder de vista que la pérdida de expresión de SHP-1 provoca cambios en la metilación de un gran número de secuencias con importantes funciones como muestran los análisis de ontología génica, y cuyo papel sería interesante dilucidar en estudios posteriores.

2. SHP-1 regula la expresión interaccionando directa o indirectamente con proteínas epigenéticas.

Como hemos descrito en la introducción, SHP-1 regula la actividad de un gran número de proteínas mediante el control de su estado de fosforilación, muchas de las cuales van a regular directa o indirectamente la expresión génica. En cáncer de próstata, SHP-1 regula los niveles del inhibidor de ciclo celular p27 a través de la vía PI3K-AKT⁵⁷. Recientemente se ha descrito que esta vía regula la fosforilación y actividad de distintas proteínas epigenéticas³¹⁵. Otra de las rutas reguladas por SHP-1 es la vía JAK/STAT, que controla importantes procesos implicados en la progresión tumoral como la transición epitelio-mesénquima (EMT), la renovación de las células madre cancerígenas y la diferenciación celular³¹⁶. Especialmente interesante para nuestro estudio fue el trabajo publicado por Dawson *et al.* (2012) en el que demostraba por primera vez, que JAK2 se localiza en el núcleo de células hematopoyéticas donde regula la fosforilación de la Y41 de la histona H3 (H3Y41P). Esta modificación se localiza en promotores transcripcionalmente activos¹⁹³.

En este trabajo, hemos identificado por primera vez la interacción entre SHP-1 y JAK2, tanto *in vitro* como *in vivo*, en las células de cáncer de próstata LNCaP y PC3, y hemos observado que se produce un aumento de la forma total y fosforilada (p-JAK2) de JAK2 en aquellas células que no expresan SHP-1. Esto concuerda con diferentes estudios en los que se demuestra que SHP-1 defosforila e induce la degradación de JAK2^{275,276}.

A la vista de estos datos, es lógico pensar que la ausencia de SHP-1 podría estar provocando un aumento en el estado de fosforilación y actividad de JAK2 y, por tanto, un aumento en la fosforilación de H3Y41. Esta modificación unida a la falta de metilación de los promotores podía ser responsable del aumento en la expresión de *RunX1T1*, *Gstp1* y *Kit* observada en células de cáncer de próstata al anular SHP-1. Sin embargo, aunque nosotros si observamos la pérdida de metilación al anular SHP-

1, no hemos podido confirmar si este efecto se asocia con cambios en la fosforilación de histonas de manera directa o indirecta a través de la regulación de JAK2, y de este modo justificar el aumento en la expresión observado.

Otra posibilidad es que SHP-1, presente en el núcleo de las células de cáncer de próstata LNCaP y PC3, regule la expresión génica mediante el control de la actividad de proteínas epigenéticas. En este sentido, nuestros datos demuestran por primera vez, la interacción, tanto *in vitro* como *in vivo*, entre la fosfatasa SHP-1 y la histona desacetilasa HDAC2 en células cancerígenas prostáticas. Además, nuestros resultados indican que la anulación de SHP-1 afecta la actividad de HDAC2, ya que a pesar de que la disminución de expresión de SHP-1 no modifica los niveles totales de HDAC2, si produce un aumento de los niveles de acetilación globales y en los promotores de algunos genes seleccionados en el *array* de metilación (*Gstp1* y *Kit*), cuya expresión aumenta cuando no se expresa esta fosfatasa. A diferencia de nuestros resultados, González-Zuñiga *et al.*¹⁵⁶ si observaron una disminución de los niveles de HDAC2 cuando inhibían la expresión de la quinasa c-Abl, aunque no se veían afectados los niveles de RNAm³¹⁷. Por lo que nuestros resultados parecen indicar que la ausencia de SHP-1 produce una disminución de la actividad represora de HDAC2 sin modificar sus niveles. Es posible que esta fosfatasa esté regulando, de manera directa o indirecta, la actividad de HDAC2 ya sea por cambios en su localización subcelular, en sus modificaciones post-traduccionales y/o incluso regulando alguna de las proteínas del complejo represor multiproteico del que forma parte, que son los principales mecanismos para regular las HDACs de clase I³¹⁸.

Algunos inhibidores de HDACs (HDACi) ejercen su efecto impidiendo la translocación de las HDACs al núcleo. Este es el caso de la tricostatina A, que reduce la asociación de la HDAC1 a la cromatina produciendo un aumento de sus niveles en el citosol, pero sin afectar a los niveles totales de expresión de la proteína³¹⁹. De igual modo, HDAC4 permanece atrapada en el citosol hasta que la defosforila la fosfatasa PP2A³²⁰. En el caso de HDAC2, se ha observado que la fosforilación de la tirosina 222 (HDAC2P222) por la quinasa c-Abl evita su degradación e induce su actividad represora. Además, la inhibición de esta quinasa evita el reclutamiento de HDAC2 a los promotores^{156,317}. Curiosamente, estudios anteriores demostraron que las formas fosforiladas de HDAC2 en residuos de serina son reclutadas por factores de transcripción a las regiones promotoras donde desacetilan, mientras que HDAC2 no fosforilada se relaciona con regiones codificantes de genes transcritos³²¹. Sin embargo, en nuestro trabajo hemos demostrado que en las células LNCaP donde se

anula la expresión de SHP-1, los promotores de *Gstp1* y *Kit* se asocian con histonas acetiladas y se correlacionan con mayores niveles de expresión, a pesar de no encontrar cambios en la localización de HDAC2 cuando se anula SHP-1, ni de obtener resultados concluyentes sobre el estado de fosforilación de HDAC2 en ausencia de esta fosfatasa.

Esto nos hace plantearnos que quizá SHP-1 este participando en la formación de los complejos multiproteicos imprescindibles para que las HDACs realicen su función, ya que no son capaces de unirse a la cromatina por sí solas³²². La interacción que se produce entre SHP-1 y HDAC2, y el aumento de acetilación global observado cuando se anula esta fosfatasa, sugiere que SHP-1 podría regular a alguna de las proteínas de estos complejos o que directamente forme parte de ellos. En este sentido, estudios recientes han probado la presencia de fosfatasas en estos complejos multiproteicos represores^{323,324}, concretamente se ha observado que la fosfatasa Repo-Man forma parte de uno de estos complejos represores al estar interaccionando con miembros de tres de ellos, y que además esta fosfatasa se encarga de mantener a la histona H3 defosforilada, para favorecer la desacetilación de las histonas y provocar que la cromatina se mantenga transcripcionalmente reprimida³²⁵. Por todo esto resultará de gran interés estudiar si existen interacciones entre SHP-1 y alguna de las proteínas que forman parte del complejo represor de HDAC2.

En conclusión, hemos descrito por primera vez la interacción entre SHP-1 y JAK2 en células de cáncer de próstata, además de demostrar que SHP-1 regula la actividad de JAK2. Por otro lado, hemos identificado por primera vez la interacción entre SHP-1 y HDAC2 en células de cáncer de próstata que podría ser la responsable de los cambios epigenéticos y de expresión encontrados. Sin embargo, es necesario profundizar en las consecuencias funcionales de esta interacción para lo que sería necesario, por un lado, estudiar mediante ensayos de ChIP-seq los cambios de acetilación que se producen cuando se anula SHP-1, y por otro lado, resultaría interesante analizar si SHP-1 regula la fosforilación de HDAC2 y su localización en los promotores de los genes. Además de realizar un estudio que nos permita determinar todas las moléculas con las que interacciona SHP-1, y en concreto aquellas proteínas epigenéticas que nos ayuden a explicar los cambios en las modificaciones epigenéticas y los cambios de expresión que hemos descrito en este trabajo.

3. SHP-1 regula la progresión tumoral en células de cáncer de próstata

El desarrollo del cáncer se debe a alteraciones genéticas y epigenéticas que provocan que una única célula prolifere descontroladamente. Estas alteraciones aportan una ventaja selectiva a las células tumorales haciéndolas más aptas para la supervivencia, proliferación y para la propagación por el resto del organismo, al hacer que adquieran capacidades invasivas y metastásicas.

Hasta el momento son muchas las alteraciones en moléculas implicadas en la señalización celular que se han asociado al desarrollo y progresión del cáncer de próstata. Con este trabajo aportamos nuestro granito de arena identificando a SHP-1 como un supresor de la progresión tumoral en próstata, ya que su anulación en las células LNCaP provoca un aumento de la migración, invasión, adhesión y proliferación, procesos muy importantes en la progresión del cáncer a etapas metastásicas. Distintos estudios han demostrado previamente el papel supresor de tumores de SHP-1: en células de carcinoma gástrico la expresión de SHP-1 en células que carecían de ella provoca la disminución de la proliferación, la migración y la invasión celular³²⁶; en el sistema hematopoyético la disminución o anulación total de su actividad provoca linfomas, leucemias y otras enfermedades relacionadas, sugiriéndose que la pérdida de expresión de SHP-1 contribuye a la transformación maligna y a un incremento de la agresividad³²⁷.

Una de las vías de señalización reguladas por SHP-1 es JAK/STAT. La activación de SHP-1 provoca la defosforilación de JAK y/o STAT y la inhibición de esta vía²⁷⁵. En cáncer de mama, hepatocarcinoma y en sistema hematopoyético SHP-1 suprime el crecimiento celular y regula la transición epitelio mesénquima (EMT) inhibiendo la actividad y los niveles de la vía JAK/STAT^{72,275,328}. Por último, esta fosfatasa está implicada en el mecanismo de acción de fármacos como el sorafenib, aprobado para el tratamiento del carcinoma hepático, que estimula la actividad de SHP-1 provocando la defosforilación de STAT3, la inhibición de la ruta JAK/STAT y de la EMT^{72,328}. En nuestro trabajo hemos demostrado que JAK2 puede ser sustrato de SHP-1 ya que ambas proteínas interaccionan, por lo que la falta de esta fosfatasa puede ser responsable del aumento de fosforilación en tirosina de JAK2. La anulación de SHP-1 también provoca un aumento de los niveles de JAK2, que puede contribuir al aumento de fosforilación observado. En estas condiciones las células presentan una mayor proliferación, adhesión, migración e invasión lo que nos permite relacionar la anulación de SHP-1 en las células LNCaP donde JAK2 permanece activo, con estos

cambios fenotípicos característicos de la progresión tumoral. Por lo tanto, SHP-1 regula la actividad de la vía JAK/STAT modificando la fosforilación y la expresión de JAK2, y favoreciendo la progresión tumoral.

El efecto tumorigénico provocado por la anulación de SHP-1 podría deberse también, al aumento de expresión de *Kit* y *RunX1t1* junto con el silenciamiento epigenético de *CEBPD*. Como ya hemos comentado anteriormente, *Kit* y *RunX1t1* se pueden comportar como oncogenes dependiendo del tipo tumoral, aunque no hay datos sobre su papel en cáncer de próstata. Por el contrario, *CEBPD* se ha propuesto como un gen supresor de tumores en cáncer de próstata donde está inactivado, y su activación induce apoptosis³¹⁴, además su expresión está regulada por los andrógenos³¹¹. En células de leucemia mielogénica se ha observado que *CEBPD* inhibe el crecimiento tumoral regulando los niveles de componentes de la maquinaria que controla el ciclo celular^{311,329}. Resultados previos de nuestro grupo han demostrado que SHP-1 controla la proliferación de células prostáticas regulando también los niveles de alguno de estos componentes⁵⁷. Por lo tanto, sería interesante analizar si SHP-1 lleva a cabo estos efectos regulando los niveles de *CEBPD*. Además, deberíamos estudiar la participación de AR en este posible mecanismo y su implicación en la progresión a cáncer de próstata resistente a la castración.

Por último, nuestros datos apuntan a que la anulación de SHP-1 podría contribuir a la proliferación de los tumores de próstata sometidos a ablación androgénica. La eliminación de SHP-1 en células LNCaP, que crecen en ausencia de suero, mimetiza el fenotipo de los tumores de próstata resistentes a la castración (CRPC) ya que aumenta la proliferación, disminuye su sensibilidad a andrógenos y, por el contrario, responden mejor a factores de crecimiento, lo que indica que en estas condiciones las células pueden crecer en ausencia de andrógenos. Previamente, nuestro grupo demostró que los tumores de próstata más agresivos e indiferenciados pierden SHP-1³⁰, lo que apoyaría la implicación de SHP-1 en la progresión del cáncer de próstata a la fase resistente a la castración. A este respecto, no todos los datos son concluyentes, ya que nuestro grupo también ha observado que en las células PC3, por el contrario, la ausencia de SHP-1 inhibe la proliferación celular⁵⁷. Las razones de esta discrepancia pueden deberse a las propias características específicas de las células prostáticas PC3: estas células no expresan AR y sus características, aunque existe controversia al respecto, son similares a un cáncer de próstata neuroendocrino que representa un grupo minoritario dentro de los tipos de cáncer de próstata. Sin embargo, nuestros resultados en células LNCaP quedan en consonancia con lo

demostrado por otros autores^{330,331}, y hace más plausible la sugerencia postulada por López-Ruiz *et al.*, sobre los diferentes efectos/funciones de SHP-1 dependiendo del tipo celular, la localización subcelular y las interacciones con otras proteínas⁵³.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que SHP-1 se comporta como un gen supresor de la progresión tumoral controlando la expresión génica mediante la regulación, de manera directa o indirecta, de las proteínas responsables de las modificaciones epigenéticas. Por todo esto, nos parece de vital importancia determinar en profundidad los mecanismos moleculares por los que SHP-1 regula la actividad de las proteínas responsables de la metilación del DNA y de la acetilación de histonas. Por otro lado, la regulación de la vía JAK/STAT puede contribuir al papel de SHP-1 en la progresión tumoral del cáncer de próstata, aunque es necesario profundizar en los mecanismos responsables de esta regulación. Con este estudio pretendemos no solo entender mejor el porqué de la progresión del cáncer de próstata a la fase resistente a la castración, sino también, ayudar a diseñar nuevas terapias que ayuden a prevenir estos procesos de resistencia.

Conclusiones

Las conclusiones del presente trabajo son:

- La tirosina fosfatasa SHP-1 se localiza en el núcleo y en el citoplasma de las células de cáncer de próstata LNCaP y PC3.
- La anulación de la expresión de SHP-1 en las células LNCaP modifica los niveles de metilación de los promotores de genes implicados en la regulación de la muerte celular, la migración y la proliferación.
- La hipometilación de los promotores de *RunX1T1*, *Gstp1* y *Kit*, provocada por la pérdida de expresión de SHP-1 en las células LNCaP, produce un aumento de su expresión.
- La hipermetilación del promotor de *CEBPD*, al anular la expresión de SHP-1 en las células LNCaP, produce una disminución de su expresión.
- SHP-1 interacciona con JAK2 regulando su estado de fosforilación, y por tanto su actividad.
- SHP-1 interacciona con la histona desacetilasa HDAC2 y modula su actividad, ya que la anulación de SHP-1 aumenta la acetilación de la histona H3 de manera global, y específicamente la de los promotores de *GSTP1* y *Kit*.
- Los cambios en la actividad de HDAC2 inducidos por SHP-1 no se deben a cambios en los niveles ni en la localización de la proteína.
- Las células que han perdido la expresión de SHP-1 proliferan en ausencia de andrógenos y son insensibles a ellos, pero responden mejor a factores de crecimiento (EGF), comportándose como las células de carcinoma prostático resistentes a la castración (CRPC).
- La anulación de SHP-1 favorece los procesos de adhesión, migración e invasión lo que sugiere que esta fosfatasa está implicada en la progresión tumoral del cáncer de próstata.

Bibliografía

1. Baluja-conde IB, Monoclonales LDA, Inmunoensayo C De. Próstata : Prostatitis E Hiperplasia. 2007;18(1):47–59.
2. Warhol MJ, Longtine JA. The Ultrastructural Localization of Prostatic Specific Antigen and Prostatic Acid Phosphatase in Hyperplastic and Neoplastic Human Prostates. *J Urol.* 1985; 134(3):607–13.
3. Bonkhoff H. Neuroendocrine cells in benign and malignant prostate tissue: morphogenesis, proliferation, and androgen receptor status. *Prostate Suppl.* 1998; 8:18–22.
4. Aaron L, Franco OE, Hayward SW. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urol Clin North Am.* 2016;43(3):279–88.
5. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-tieulent J, Jemal A. Global Cancer Statistics, 2012. *CA a cancer J Clin.* 2015;65(2):87–108.
6. Forman D, Bray F, Brewster DH, Mbalawa CG, Kohler B, Piñeros M, et al. Cancer Incidence in Five Continents Vol. X. Vol. X. 2014.
7. Gronberg H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet.* 2003;361(9360):859–64.
8. Crawford DE. Complementary Medicine, Chemoprevention, and Staging of Prostate Cancer. *Rev Urol.* 2003;5 Suppl 6:S23–32.
9. Hussein S, Satturwar S, Van der Kwast T. Young-age prostate cancer. *J Clin Pathol.* 2015;68(7):511–5.
10. Russell PJ, Bennett S, Stricker P. Growth factor involvement in progression of prostate cancer. *Clin Chem.* 1998;44(4):705–23.
11. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev.* 2004;25(2):276–308.
12. Rove KO, Crawford ED. Traditional androgen ablation approaches to advanced prostate cancer: new insights. *Can J Urol.* 2014;21(April):14–21.
13. Kirby M, Hirst C, Crawford ED. Characterising the castration-resistant prostate cancer population: A systematic review. *Int J Clin Pract.* 2011;65(11):1180–92.
14. Stanbrough M, Bubley GJ, Ross K, Golub TR, Rubin MA, Penning TM, et al. Increased expression of genes converting adrenal androgens to testosterone in androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 2006;66(5):2815–25.

15. Grasso CS, Wu Y, Robinson DR, Cao X, Saravana M, Khan AP, et al. The Mutational Landscape of Lethal Castrate Resistant Prostate Cancer. *Nature*. 2012;487(7406):239–43.
16. Mills IG. Maintaining and reprogramming genomic androgen receptor activity in prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(3):187–98.
17. Aggarwal RR, Feng FY, Small EJ. Emerging Categories of Disease in Advanced Prostate Cancer and Their Therapeutic Implications. *Oncology (Williston Park)*. 2017; 31(6):467–74.
18. Watson PA, Arora VK, Sawyers CL. Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015 Dec 13;15(12):701–11.
19. Alonso A, Sasin J, Bottini N, Friedberg I, Friedberg I, Osterman A, et al. Protein Tyrosine Phosphatases in the Human Genome. 2004;117:699–711.
20. Irandoust M, van den Berg TK, Kaspers GJL, Cloos J. Role of tyrosine phosphatase inhibitors in cancer treatment with emphasis on SH2 domain-containing tyrosine phosphatases (SHPs). *Anticancer Agents Med Chem*. 2009;9(2):212–20.
21. Alonso A, Pulido R. The extended human PTPome: a growing tyrosine phosphatase family. *FEBS J*. 2015 Apr;283(4):1–26.
22. Taberner L, Aricescu AR, Jones EY, Szedlacsek SE. Protein tyrosine phosphatases: Structure-function relationships. *FEBS J*. 2008;275(5):867–82.
23. Andersen JN, Mortensen OH, Peters GH, Drake PG, Iversen LF, Olsen OH, et al. Structural and Evolutionary Relationships among Protein Tyrosine Phosphatase Domains. *Mol Cell Biol*. 2001;21(21):7117–36.
24. Ostman A, Bohmer FD. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. *Trends Cell Biol*. 2001;11(6):258-66.
25. Östman A, Hellberg C, Böhmer FD. Protein-tyrosine phosphatases and cancer. 2006;6(April):307–20.
26. Sharma Y, Bashir S, Bhardwaj P, Ahmad A, Khan F. Protein tyrosine phosphatase SHP-1: resurgence as new drug target for human autoimmune disorders. *Immunol Res*. 2016;
27. Mok SC, Kwok TT, Berkowitz RS, Barrett AJ, Tsui FW. Overexpression of the protein tyrosine phosphatase, nonreceptor type 6 (PTPN6), in human epithelial ovarian cancer. Vol. 57, *Gynecologic oncology*. 1995. p. 299–303.
28. Yip SS, Crew AJ, Gee JMW, Hui R, Blamey RW, Robertson JFR, et al. Up-

- regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in human breast cancer and correlation with GRB2 expression. *Int J Cancer*. 2000 Nov; 88(3):363–8.
29. Douziech N, Calvo E, Coulombe Z, Muradia G, Bastien J, Aubin RA, et al. Inhibitory and Stimulatory Effects of Somatostatin on Two Human Pancreatic Cancer Cell Lines: A Primary Role for Tyrosine Phosphatase SHP-1. *Endocrinology*. 1999 Feb; 140(2):765–77.
 30. Zapata PD, Ropero RM, Valencia AM, Buscail L, Lopez JI, Martin-Orozco RM, et al. 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*. 2002 Feb;87(2):915–26.
 31. Shultz LD, Schweitzer PA, Rajan T V., Yi T, Ihle JN, Matthews RJ, et al. Mutations at the murine *motheaten* locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (*Hcph*) gene. *Cell*. 1993;73(7):1445–54.
 32. Green MC, Shultz LD. *Motheaten*, an Immunodeficient Mutant of the Mouse. *J Hered*. 1975;66:250–8.
 33. Pluzky J, Neel BG, Rosebmerg RD, Eddy RL, Byers MG, Show TB. Chromosomal Localization of an SH2-Containing Tyrosine Phosphatase (PTP^{NG}). *Genomics*. 1992;13:869–72.
 34. Banville D, Stocco R, Shen SH. Human protein tyrosine phosphatase 1C (PTP^{N6}) gene structure: alternate promoter usage and exon skipping generate multiple transcripts. Vol. 27, *Genomics*. 1995. p. 165–73.
 35. Evren S, Wan S, Ma XZ, Fahim S, Mody N, Sakac D, et al. Characterization of SHP-1 protein tyrosine phosphatase transcripts, protein isoforms and phosphatase activity in epithelial cancer cells. *Genomics*. 2013;102(5–6):491–9.
 36. 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*. 1999;274(40):28301–7.
 37. Craggs G, Kellie S. A functional nuclear localization sequence in the C-terminal domain of SHP-1. *J Biol Chem*. 2001;276(26):23719–25.
 38. Poole AW, Jones ML. A SHP^{ing} tale: Perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail. *Cell Signal*. 2005;17(11):1323–32.
 39. Pei D, Wang J, Walsh CT. Differential functions of the two Src homology 2 domains in protein tyrosine phosphatase SH-PTP1. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

- 1996;93(3):1141–5.
40. Yang J, Liu L, He D, Song X, Liang X, Zhao ZJ, et al. Crystal Structure of Human Protein-tyrosine Phosphatase SHP-1. *J Biol Chem*. 2003;278(8):6516–20.
 41. Wang W, Liu L, Song X, Mo Y, Komma C, Bellamy HD, et al. Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase SHP-1 in the open conformation. *J Cell Biochem*. 2011;112(8):2062–71.
 42. Mino 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*. 2004 Oct 23;103(4):1398–407.
 43. 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.
 44. Uchida T, Matozaki T, Noguchi T, Yamao T, Horita K, Suzuki T, et al. Insulin stimulates the phosphorylation of Tyr538 and the catalytic activity of PTP1C, a protein tyrosine phosphatase with Src homology-2 domains. *J Biol Chem*. 1994;269(16):12220–8.
 45. Frank C, Burkhardt C, Imhof D, Ringel J, Zschö O, Wieligmann K, et al. Effective Dephosphorylation of Src Substrates by SHP-1. *J Biol Chem*. 2003;279(12):11375–83.
 46. Brumell JH, Chan CK, Butler J, Borregaard N, Siminovitch KA, Grinstein S, et al. Regulation of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase 1 during activation of human neutrophils. Role of protein kinase C. *J Biol Chem*. 1997;272(2):875–82.
 47. Jones ML, Craik JD, Gibbins JM, Poole AW. Regulation of SHP-1 tyrosine phosphatase in human platelets by serine phosphorylation at its C terminus. *J Biol Chem*. 2004;279(39):40475–83.
 48. Liu Y, Kruhlak MJ, Hao J-J, Shaw S. Rapid T cell receptor-mediated SHP-1 S591 phosphorylation regulates SHP-1 cellular localization and phosphatase activity. *J Leukoc Biol*. 2007;82(3):742–51.
 49. Frank C, Keilhack H, Opitz F, Zschörnig O, Böhmer F-D. Binding of Phosphatidic Acid to the Protein-Tyrosine Phosphatase SHP-1 as a Basis for Activity Modulation †. *Biochemistry*. 1999 Sep; 38(37):11993–2002.
 50. Yang W, Tabrizi M, Yi T. A Bipartite NLS at the SHP-1 C-Terminus Mediates Cytokine-Induced SHP-1 Nuclear Localization in Cell Growth Control. *Blood*

- Cells, *Mol Dis.* 2002;28(1):63–74.
51. Aoki K, Didomenico E, Sims NA, Mukhopadhyay K, Neff L, Houghton A, et al. The tyrosine phosphatase SHP-1 is a negative regulator of osteoclastogenesis and osteoclast resorbing activity: Increased resorption and osteopenia in me(v)/me(v) mutant mice. *Bone.* 1999;25(3):261–7.
 52. García-Tello A, Angulo JC, Rodríguez-Ubreva J, Andrés G, López JI, Sánchez-Chapado M, et al. Anatomía de la próstata en ratones motheaten viable (mev) con mutaciones en el gen de la proteína tirosina fosfatasa SHP-1. *Actas Urológicas Españolas.* 2014;38(7):438–44.
 53. López-Ruiz P, Rodríguez-Ubreva J, Cariaga AE, Cortes MA, Colás B. SHP-1 in cell-cycle regulation. *Anticancer Agents Med Chem.* 2011 Jan;11(1):89–98.
 54. Kanagasundaram V, Jaworowski A, Byrne R, Hamilton JA. Separation and Characterization of the Activated Pool of Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Forming Distinct Multimeric Complexes with Signalling Molecules in Macrophages. *Mol Cell Biol.* 1999 Jun 1;19(6):4079–92.
 55. Zhang Q, Raghunath PN, Vonderheid E, Ødum N, Wasik MA. Lack of phosphotyrosine phosphatase SHP-1 expression in malignant T-cell lymphoma cells results from methylation of the SHP-1 promoter. *Am J Pathol.* 2000;157(4):1137–46.
 56. Ganesan LP, Fang H, Marsh CB, Tridandapani S. The Protein-tyrosine Phosphatase SHP-1 Associates with the Phosphorylated Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif of FcγRIIIa to Modulate Signaling Events in Myeloid Cells. *J Biol Chem.* 2003 Sep 12;278(37):35710–7.
 57. Rodríguez-Ubreva FJ, Cariaga-Martínez a E, Cortés M a, Romero-De Pablos M, Ropero S, López-Ruiz P, et al. 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.* 2010;29(3):345–55.
 58. 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.* 2009;21(11):1634–44.
 59. Rinna A, Forman HJ. SHP-1 inhibition by 4-hydroxynonenal activates Jun N-terminal kinase and glutamate cysteine ligase. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;39(1):97–104.
 60. Matsubara H, Shibasaki Y, Okigaki M, Mori Y, Masaki H, Kosaki a, et al. 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.* 2001;282(5):1085–91.
61. Nakagami H, Cui T-X, Iwai M, Shiuchi T, Takeda-Matsubara Y, Wu L, et al. Tumor Necrosis Factor- α Inhibits Growth Factor-Mediated Cell Proliferation Through SHP-1 Activation in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(2):238–42.
 62. Nakata K, Suzuki Y, Inoue T, Ra C, Yakura H, Mizuno K. Deficiency of SHP1 leads to sustained and increased ERK activation in mast cells, thereby inhibiting IL-3-dependent proliferation and cell death. *Mol Immunol.* 2011;48(4):472–80.
 63. Simoneau M, Boulanger J, Coulombe G, Renaud MA, Duchesne C, Rivard N. Activation of Cdk2 stimulates proteasome-dependent truncation of tyrosine phosphatase SHP-1 in human proliferating intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 2008;283(37):25544–56.
 64. Keilhack H, Hellman U, Van Hengel J, Van Roy F, Godovac-Zimmermann J, Böhmer FD. The protein-tyrosine phosphatase SHP-1 binds to and dephosphorylates p120 catenin. *J Biol Chem.* 2000;275(34):26376–84.
 65. Schnekenburger J, Mayerle J, Krüger B, Buchwalow I, Weiss FU, Albrecht E, et al. Protein tyrosine phosphatase kappa and SHP-1 are involved in the regulation of cell-cell contacts at adherens junctions in the exocrine pancreas. *Gut.* 2005;54(10):1445–55.
 66. 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.* 2007;22(11):1251–67.
 67. Wen L-Z, Ding K, Wang Z-R, Ding C-H, Lei S, Liu J, et al. SHP-1 Acts as a Tumor Suppressor in Hepatocarcinogenesis and HCC Progression. *Cancer Res.* 2018 Aug 15;78(16):4680–91.
 68. Wu C, Sun M, Liu L, Zhou GW. The function of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in cancer. *Gene.* 2003;306(1–2):1–12.
 69. Tao T, Yang X, Zheng J, Feng D, Qin Q, Shi X, et al. PDZK1 inhibits the development and progression of renal cell carcinoma by suppression of SHP-1 phosphorylation. *Oncogene.* 2017;(10):1–13.
 70. Leblanc C, Langlois M-J, Coulombe G, Vaillancourt-Lavigueur V, Jones C, Carrier JC, et al. Epithelial Src homology region 2 domain-containing

- phosphatase-1 restrains intestinal growth, secretory cell differentiation, and tumorigenesis. *FASEB J.* 2017 Aug;31(8):3512–26.
71. Tassidis H, Brokken LJS, Jirström K, Ehrnström R, Pontén F, Ulmert D, et al. Immunohistochemical detection of tyrosine phosphatase SHP-1 predicts outcome after radical prostatectomy for localized prostate cancer. *Int J Cancer.* 2010;126:2296–307.
 72. Fan L-C, Shiao C-W, Tai W-T, Hung M-H, Chu P-Y, Hsieh F-S, et al. SHP-1 is a negative regulator of epithelial–mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 2015 Oct 26; 34(41):5252–63.
 73. Fan L, Teng H, Shiao C, Tai W, Yang S, Jiang J, et al. Regorafenib (Stivarga) pharmacologically targets epithelial- mesenchymal transition in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2016;7(September 2012):64136–47.
 74. Wu Y, Li R, Zhang J, Wang G, Liu B, Huang X, et al. Protein tyrosine phosphatase SHP-1 sensitizes EGFR/HER-2 positive breast cancer cells to trastuzumab through modulating phosphorylation of EGFR and HER-2. *Oncotargets Ther.* 2015;8:2577–87.
 75. C. H. Waddington SD. An introduction to modern genetics. *Eugen Rev.* 1940;31(4):218.
 76. Waddington CH. . *The Epigenetics of Birds.* Cambridge, 1952. Cambridge University Press. -Pp. xvi+272. Price. Cambridge Univ Press. 1952;54–5.
 77. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* 2009;23(7):781–3.
 78. Wu Ct, Morris JR. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science.* 2001;293(5532):1103–5.
 79. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003;33 Suppl(march):245–54.
 80. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(30):10604–9.
 81. Sharma S, Kelly TK, Jones P a. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis.* 2010 Jan; 31(1):27–36.
 82. Yeğin Z, Avsar C. Reflections on the Significance of DNA Methylation in Living Organisms : from Bacteria to Humans. *Res J Biol.* 2016;4(2):11–5.
 83. Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG Islands in vertebrate genomes. *J Mol*

- Biol. 1987;196(2):261–82.
84. Esteller M. Epigenetics in biology and medicine. CRC Press; 2009. 105–130 p.
 85. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development. *Science* (80-). 2001;293(August):1089–94.
 86. Goto T, Monk M. Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(2):362–78.
 87. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*. 2007;8(4):286–98.
 88. Esteller M. The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis*. 2006 Jun; 27(6):1121–5.
 89. Jones PA. The DNA methylation paradox. *Trends Genet*. 1999;15(1):34–7.
 90. Laurent L, Wong E, Li G, Huynh T, Tsigos A, Ong CT, et al. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res*. 2010;20:320–31.
 91. Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, Kerr ARW, James KD, Turner DJ, et al. Orphan CpG Islands Identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet*. 2010;6(9).
 92. Esteller M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet*. 2003;4:351–8.
 93. Li E, Zhang Y. DNA Methylation in Mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;6.
 94. Hamidi T, Singh AK, Chen T. Genetic alterations of DNA methylation machinery in human diseases. *Epigenomics*. 2015;7(2):247–65.
 95. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*. 2000;9(16):2395–402.
 96. Mortusewicz O, Schermelleh L, Walter J, Cardoso MC, Leonhardt H. Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(25):8905–9.
 97. Hermann A, Goyal R, Jeltsch A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J Biol Chem*. 2004;279(46):48350–9.
 98. Arand J, Spieler D, Karius T, Branco MR, Meilinger D, Meissner A, et al. In Vivo Control of CpG and Non-CpG DNA Methylation by DNA Methyltransferases. Schübeler D, editor. *PLoS Genet*. 2012 Jun 28;8(6):e1002750.
 99. Jair K-W, Bachman KE, Suzuki H, Ting AH, Rhee I, Yen R-WC, et al. De novo CpG Island Methylation in Human Cancer Cells. *Cancer Res*. 2006 Jan

- 15;66(2):682–92.
100. Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 1992;69(6):915–26.
 101. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99(3):247–57.
 102. Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, et al. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene*. 1999;236(1):87–95.
 103. Chen T, Ueda Y, Dodge JE, Wang Z, Li E. Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol*. 2003 Aug;23(16):5594–605.
 104. Raddatz G, Gao Q, Bender S, Jaenisch R, Lyko F. Dnmt3a Protects Active Chromosome Domains against Cancer-Associated Hypomethylation. *Ren B*, editor. *PLoS Genet*. 2012 Dec 20;8(12):e1003146.
 105. Barau J, Teissandier A, Zamudio N, Roy S, Nalesso V, Hérault Y, et al. The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. *Science* (80-). 2016 Nov 18;354(6314):909–12.
 106. Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, Takeshima H, Tajima S. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem*. 2004;279(26):27816–23.
 107. Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science*. 2001;294(5551):2536–9.
 108. Bourc'his D, Bestor TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*. 2004;431(7004):96–9.
 109. Zamudio NM, Scott HS, Wolski K, Lo CY, Law C, Leong D, et al. DNMT3L is a regulator of X chromosome compaction and post-meiotic gene transcription. *PLoS One*. 2011;6(3).
 110. Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh C, Zhang X, et al. Methylation of tRNA Asp by the DNA Methyltransferase Homolog Dnmt2. *Science*. 2006;311(January):395–8.
 111. Dong A. Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA. *Nucleic Acids Res*. 2001 Jan 15;29(2):439–48.
 112. Hermann A, Schmitt S, Jeltsch A. The Human Dnmt2 Has Residual DNA-

- (Cytosine-C5) Methyltransferase Activity. *J Biol Chem.* 2003 Aug 22;278(34):31717–21.
113. Jia D, Jurkowska RZ, Zhang X, Jeltsch A, Cheng X. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature.* 2007 Sep 22;449(7159):248–51.
114. Wang J, Hevi S, Kurash JK, Lei H, Gay F, Bajko J, et al. The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat Genet.* 2009 Jan 21;41(1):125–9.
115. Esteve P-O, Chin HG, Benner J, Feehery GR, Samaranyake M, Horwitz GA, et al. Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2009 Mar 31;106(13):5076–81.
116. Estève P-O, Chang Y, Samaranyake M, Upadhyay AK, Horton JR, Feehery GR, et al. A methylation and phosphorylation switch between an adjacent lysine and serine determines human DNMT1 stability. *Nat Struct Mol Biol.* 2011 Jan 12;18(1):42–8.
117. Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.* 1999 Jan 1;27(11):2291–8.
118. Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet.* 1998;19(june):187–91.
119. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature.* 1998;393(6683):386–9.
120. Zhu H, Wang G, Qian J. Transcription factors as readers and effectors of DNA methylation. *Nat Rev Genet.* 2016;17(9):551–65.
121. Comb M, Goodman HM. CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(13):3975–82.
122. Holler M, Westin G, Jiricny J, Schaffner W. Spl transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated. *Genes Dev.* 1988;2:1127–35.
123. Radtke F, Hug M, Georgiev O, Matsuo K, Schaffner W. Differential sensitivity of zinc finger transcription factors MTF-1, Sp1 and krox-20 to CpG methylation of

- their binding sites. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1996;377(1):47–56.
124. Yin Y, Morgunova E, Jolma A, Kaasinen E, Sahu B, Khund-Sayeed S, et al. Impact of cytosine methylation on DNA binding specificities of human transcription factors. *Science* (80-). 2017 May 5;356(6337):eaaj2239.
 125. Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, et al. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol*. 2000;10(8):475–8.
 126. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*. 2000;403(6769):501–2.
 127. Ooi SKT, Bestor TH. The Colorful History of Active DNA Demethylation. *Cell*. 2008;133(7):1145–8.
 128. Wang Q, Li W, Zhang Y, Yuan X, Xu K, Yu J, et al. Androgen Receptor Regulates a Distinct Transcription Program in Androgen-Independent Prostate Cancer. *Cell*. 2009 Jul 23; 138(2):245–56.
 129. Maiti A, Drohat AC. Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: Potential implications for active demethylation of CpG sites. *J Biol Chem*. 2011;286(41):35334–8.
 130. Iurlaro M, Ficiz G, Oxley D, Raiber E-A, Bachman M, Booth MJ, et al. A screen for hydroxymethylcytosine and formylcytosine binding proteins suggests functions in transcription and chromatin regulation. *Genome Biol*. 2013;14(10):R119.
 131. Song C-X, Szulwach KE, Dai Q, Fu Y, Mao S-Q, Lin L, et al. Genome-wide Profiling of 5-Formylcytosine Reveals Its Roles in Epigenetic Priming. *Cell*. 2013 Apr;153(3):678–91.
 132. Spruijt CG, Gnerlich F, Smits AH, Pfaffeneder T, Jansen PWTC, Bauer C, et al. Dynamic Readers for 5-(Hydroxy)Methylcytosine and Its Oxidized Derivatives. 2013;
 133. López V, Fernández AF, Fraga MF. The role of 5-hydroxymethylcytosine in development, aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev*. 2017;37:28–38.
 134. Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*. 2013;502(7472):472–9.
 135. Gu TP, Guo F, Yang H, Wu HP, Xu GF, Liu W, et al. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*. 2011;477(7366):606–10.
 136. Dawlaty MM, Breiling A, Le T, Raddatz G, Inmaculada M, Cheng AW, et al.

- Combined deficiency of Tet1 and Tet2 causes epigenetic abnormalities but is compatible with postnatal development. *Dev Cell*. 2013;24(3):310–23.
137. Dawlaty MM, Breiling A, Le T, Barrasa MI, Raddatz G, Gao Q, et al. Loss of tet enzymes compromises proper differentiation of embryonic stem cells. *Dev Cell*. 2014;29(1):102–11.
 138. Valinluck V, Sowers LC. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res*. 2007;67(3):946–50.
 139. Musselman CA, Lalonde M-E, Côté J, Kutateladze TG. Perceiving the epigenetic landscape through histone readers. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(12):1218–27.
 140. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*. 2007;128(4):693–705.
 141. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000;403(6765):41–5.
 142. ALLFREY VG, FAULKNER R, MIRSKY AE. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1964;51(1938):786–94.
 143. Wagner GR, Payne RM. Widespread and Enzyme-independent N^ε-Acetylation and N^ε-Succinylation of Proteins in the Chemical Conditions of the Mitochondrial Matrix. *J Biol Chem*. 2013;288(40):29036–45.
 144. Parthun MR, Widom J, Gottschling DE. The major cytoplasmic histone acetyltransferase in yeast: Links to chromatin replication and histone metabolism. *Cell*. 1996;87(1):85–94.
 145. Wang Y, Miao X, Liu Y, Li F, Liu Q, Sun J, et al. Dysregulation of histone acetyltransferases and deacetylases in cardiovascular diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014.
 146. Hodawadekar SC, Marmorstein R. Chemistry of acetyl transfer by histone modifying enzymes: structure, mechanism and implications for effector design. *Oncogene*. 2007;26(37):5528–40.
 147. Carrozza MJ, Utlely RT, Workman JL, Côté J. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. Vol. 19, *Trends in Genetics*. 2003. p. 321–9.
 148. Lee KK, Workman JL. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(4):284–95.
 149. Thompson PR, Wang D, Wang L, Fulco M, Pediconi N, Zhang D, et al. Regulation of the p300 HAT domain via a novel activation loop. *Nat Struct Mol*

- Biol. 2004;11(4):308–15.
150. Yuan H, Rossetto D, Mellert H, Dang W, Srinivasan M, Johnson J, et al. MYST protein acetyltransferase activity requires active site lysine autoacetylation. *EMBO J.* 2012 Jan 4;31(1):58–70.
 151. Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol.* 2007 Jun;1(1):19–25.
 152. Luo J, Su F, Chen D, Shiloh A, Gu W. Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis. *Nature.* 2000;408(6810):377–81.
 153. Seto E, Yoshida M. Erasers of histone acetylation: The histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(4):1–26.
 154. Ayer DE. Histone deacetylases: Transcriptional repression with SINers and NuRDs. *Trends Cell Biol.* 1999;9(5):193–8.
 155. Pflum MKH, Tong JK, Lane WS, Schreiber SL. Histone Deacetylase 1 Phosphorylation Promotes Enzymatic Activity and Complex Formation. *J Biol Chem.* 2001;276(50):47733–41.
 156. Gonzalez-Zuñiga M, Contreras PS, Estrada LD, Chamorro D, Villagra A, Zanlungo S, et al. c-Abl Stabilizes HDAC2 Levels by Tyrosine Phosphorylation Repressing Neuronal Gene Expression in Alzheimer's Disease. *Mol Cell.* 2014 Oct 2;56(1):163–73.
 157. Wapenaar H, Dekker FJ. Histone acetyltransferases: challenges in targeting bi-substrate enzymes. *Clin Epigenetics.* 2016;8(1):59.
 158. Marmorstein R, Zhou MM. Writers and readers of histone acetylation: Structure, mechanism, and inhibition. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(7).
 159. Mujtaba S, Zeng L, Zhou M-M. Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene.* 2007 Aug 13;26(37):5521–7.
 160. Ropero S, Esteller M. Epigenetics and Cancer DNA Methylation. In: Esteller M, editor. *Epigenetics in Biology and Medicine.* CRC Press; 2008. p. 3–16.
 161. Ejlassi-Lassalette A, Mocquard E, Arnaud M-C, Thiriet C. H4 replication-dependent diacetylation and Hat1 promote S-phase chromatin assembly in vivo. *Matera AG, editor. Mol Biol Cell.* 2011 Jan 15;22(2):245–55.
 162. Zhang H, Han J, Kang B, Burgess R, Zhang Z. Human histone acetyltransferase 1 protein preferentially acetylates H4 histone molecules in H3.1-H4 over H3.3-H4. *J Biol Chem.* 2012;287(9):6573–81.
 163. Li Q, Zhou H, Wurtele H, Davies B, Horazdovsky B, Verreault A, et al. Acetylation of Histone H3 Lysine 56 Regulates Replication-Coupled Nucleosome

- Assembly. *Cell*. 2008 Jul;134(2):244–55.
164. Han J, Zhang H, Zhang H, Wang Z, Zhou H, Zhang Z. A Cul4 E3 Ubiquitin Ligase Regulates Histone Hand-Off during Nucleosome Assembly. *Cell*. 2013 Nov;155(4):817–29.
 165. Su D, Hu Q, Li Q, Thompson JR, Cui G, Fazly A, et al. Structural basis for recognition of H3K56-acetylated histone H3–H4 by the chaperone Rtt106. *Nature*. 2012 Mar 5;483(7387):104–7.
 166. Burgess RJ, Zhou H, Han J, Zhang Z. A Role for Gcn5 in Replication-Coupled Nucleosome Assembly. *Mol Cell*. 2010 Feb;37(4):469–80.
 167. Ruiz-Carrillo A, Wangh LJ, Allfrey VG. Processing of Newly Synthesized Histone Molecules. *Science* (80-). 1975 Oct 10; 190(10):117–28.
 168. Jackson V, Shires A, Tanphaichitr N, Chalkley R. Modifications to histones immediately after synthesis. *J Mol Biol*. 1976;104(2):471–83.
 169. Annunziato AT, Seale RL. Chromatin replication, reconstitution and assembly. *Mol Cell Biochem*. 1983; 55(2):99–112.
 170. McBrien MA, Behbahan IS, Ferrari R, Su T, Huang TW, Li K, et al. Histone Acetylation Regulates Intracellular pH. *Mol Cell*. 2013;49(2):310–21.
 171. Young NL, DiMaggio PA, Garcia BA. The significance, development and progress of high-throughput combinatorial histone code analysis. *Cell Mol Life Sci*. 2010;67(23):3983–4000.
 172. Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, et al. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet*. 2007 Mar; 39(3):311–8.
 173. Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, et al. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature*. 2006;
 174. Mohan M, Herz HM, Takahashi YH, Lin C, Lai KC, Zhang Y, et al. Linking H3K79 trimethylation to Wnt signaling through a novel Dot1-containing complex (DotCom). *Genes Dev*. 2010;24(6):574–89.
 175. Schulze JM, Jackson J, Nakanishi S, Gardner JM, Hentrich T, Haug J, et al. Linking Cell Cycle to Histone Modifications: SBF and H2B Monoubiquitination Machinery and Cell-Cycle Regulation of H3K79 Dimethylation. *Mol Cell*. 2009;35(5):626–41.
 176. Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD, Patel DJ. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket

- pickers. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14(11):1025–40.
177. Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, et al. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature.* 2001 Mar 1;410(6824):120–4.
 178. Mishima Y, Jayasinghe CD, Lu K, Otani J, Shirakawa M, Kawakami T, et al. Nucleosome compaction facilitates HP1 γ binding to methylated H3K9. *Nucleic Acids Res.* 2015 Aug 28;43(21):gkv841.
 179. Flanagan JF, Mi L-Z, Chruszcz M, Cymborowski M, Clines KL, Kim Y, et al. Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature.* 2005 Dec 22;438(7071):1181–5.
 180. Siggins L, Cordeddu L, Rönnerblad M, Lennartsson A, Ekwall K. Transcription-coupled recruitment of human CHD1 and CHD2 influences chromatin accessibility and histone H3 and H3.3 occupancy at active chromatin regions. *Epigenetics Chromatin.* 2015;8(1):4.
 181. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, et al. A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. *Cell.* 2006;125(2):315–26.
 182. Kim S, Paik WK. Studies on the Origin of ϵ -N-Methyl-L-lysine in Protein Studies on the Origin in Protein. *J Biol Chem.* 1965;240(12):4629–34.
 183. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011;21(3):381–95.
 184. Huang J, Berger SL. The emerging field of dynamic lysine methylation of non-histone proteins. *Curr Opin Genet Dev.* 2008;18(2):152–8.
 185. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell.* 2004;119(7):941–53.
 186. Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, et al. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature.* 2005;439(7078):811–6.
 187. Dimitrova E, Turberfield AH, Klose RJ. Histone demethylases in chromatin biology and beyond. *EMBO Rep.* 2015;16(12):1620–39.
 188. Fatemi M, Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA. *Eur J Biochem.* 2002;269(20):4981–4.
 189. Edmondson DG, Davie JK, Zhou J, Mirnikjoo B, Tatchell K, Dent SYR. Site-

- specific loss of acetylation upon phosphorylation of histone H3. *J Biol Chem.* 2002 Aug 16; 277(33):29496–502.
190. Zippo A, Serafini R, Rocchigiani M, Pennacchini S, Krepelova A, Oliviero S. Histone Crosstalk between H3S10ph and H4K16ac Generates a Histone Code that Mediates Transcription Elongation. *Cell.* 2009;138(6):1122–36.
 191. Hirota T, Lipp JJ, Toh BH, Peters JM. Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin. *Nature.* 2005;438(7071):1176–80.
 192. Dawson M a, Bannister AJ, Göttgens B, Foster SD, Bartke T, Green AR, et al. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature.* 2009 Oct 8; 461(7265):819–22.
 193. Dawson MA, Foster SD, Bannister AJ, Robson SC, Hannah R, Wang X, et al. Three distinct patterns of histone H3Y41 phosphorylation mark active genes. *Cell Rep.* 2012 Sep 27;2(3):470–7.
 194. Mahajan K, Fang B, Koomen JM, Mahajan NP. H2B Tyr37 phosphorylation suppresses expression of replication-dependent core histone genes. *Nat Struct Mol Biol.* 2012 Sep 12; 19(9):930–7.
 195. Feldman N, Gerson A, Fang J, Li E, Zhang Y, Shinkai Y, et al. G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nat Cell Biol.* 2006 Feb 15;8(2):188–94.
 196. Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature.* 2006;439(7078):871–4.
 197. Kondo Y. Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers. *Yonsei Med J.* 2009;50(4):455–63.
 198. Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T. The Methyl-CpG-binding Protein MeCP2 Links DNA Methylation to Histone Methylation. *J Biol Chem.* 2003 Feb 7;278(6):4035–40.
 199. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
 200. Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene.* 2002;21(35):5400–13.
 201. Yang M, Park JY. DNA Methylation in Promoter Region as Biomarkers in Prostate Cancer. In: *Handbook of Epigenetics.* Elsevier; 2012. p. 67–109.
 202. Sidhu S, Deep JS, Sobti RC, Sharma VL, Thakur H. Methylation pattern of

- MGMT gene in relation to age, smoking, drinking and dietary habits as epigenetic biomarker in prostate cancer patients. *Genet Eng Biotechnol J*. 2010;(January).
203. Keil KP, Abler LL, Mehta V, Altmann HM, Laporta J, Plisch EH, et al. DNA methylation of E-cadherin is a priming mechanism for prostate development. *Dev Biol*. 2014 Mar;387(2):142–53.
 204. Kito H, Suzuki H, Ichikawa T, Kamiya NSN, Akakura K, Igarashi T, et al. Hypermethylation of the CD44 gene is associated with progression and metastasis of human prostate cancer. *Prostate*. 2001;49(2):110–5.
 205. Padar A, Sathyanarayana UG, Suzuki M, Maruyama R, Hsieh JT, Frenkel EP, et al. Inactivation of Cyclin D2 Gene in Prostate Cancers by Aberrant Promoter Methylation. *Clin Cancer Res*. 2003;9(13):4730–4.
 206. Das PM, Ramachandran K, VanWert J, Ferdinand L, Gopisetty G, Reis IM, et al. Methylation mediated silencing of TMS1/ASC gene in prostate cancer. *Mol Cancer*. 2006;5:1–10.
 207. Liu L, Kron KJ, Pethe V V., Demetrashvili N, Nesbitt ME, Trachtenberg J, et al. Association of tissue promoter methylation levels of APC, TGF β 2, HOXD3 and RASSF1A with prostate cancer progression. *Int J Cancer*. 2011;129(10):2454–62.
 208. Jerónimo C, Henrique R, Hoque MO, Ribeiro FR, Oliveira J, Fonseca D, et al. Quantitative RAR β 2 hypermethylation: A promising prostate cancer marker. *Clin Cancer Res*. 2004;10(12 I):4010–4.
 209. Youssef EM, Chen XQ, Higuchi E, Kondo Y, Garcia-Manero G, Lotan R, et al. Hypermethylation and Silencing of the Putative Tumor Suppressor Tazarotene-Induced Gene 1 in Human Cancers. *Cancer Res*. 2004;64(7):2411–7.
 210. Ge YZ, Xu LW, Jia RP, Xu Z, Feng YM, Wu R, et al. The association between RASSF1A promoter methylation and prostate cancer: Evidence from 19 published studies. *Tumor Biol*. 2014;35(4):3881–90.
 211. Li L-C, Carroll PR, Dahiya R. Epigenetic Changes in Prostate Cancer: Implication for Diagnosis and Treatment. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2005 Jan 19; 97(2):103–15.
 212. Henrique R, Jerónimo C. Molecular detection of prostate cancer: A role for GSTP1 hypermethylation. *Eur Urol*. 2004;46(5):660–9.
 213. Nakayama M, Gonzalgo ML, Yegnasubramanian S, Lin X, De Marzo AM, Nelson WG. GSTP1 CpG island hypermethylation as a molecular biomarker for prostate

- cancer. *J Cell Biochem.* 2004 Feb 15;91(3):540–52.
214. Enokida H, Shiina H, Urakami S, Igawa M, Ogishima T, Li L-C, et al. Multigene methylation analysis for detection and staging of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;
215. Goessl C, Muller M, Heicappell R, Krause H, Miller K. DNA-based detection of prostate cancer in blood, urine, and ejaculates. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;
216. Graça I, Pereira-Silva E, Henrique R, Packham G, Crabb SJ, Jerónimo C. Epigenetic modulators as therapeutic targets in prostate cancer. *Clin Epigenetics.* 2016 Dec 15;8(1):98.
217. Yegnasubramanian S. Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer Res.* 2004;64(410):1975–86.
218. Albany C, Alva AS, Aparicio AM, Singal R, Yellapragada S, Sonpavde G, et al. Epigenetics in Prostate Cancer. *Prostate Cancer.* 2011;580318.
219. Li S, Zhu Y, Ma C, Qiu Z, Zhang X, Kang Z, et al. Downregulation of EphA5 by promoter methylation in human prostate cancer. *BMC Cancer.* 2015 Dec 22;15(1):18.
220. Ashour N, Angulo JC, Andrés G, Alelú R, González-Corpas A, Toledo M V, et al. A DNA hypermethylation profile reveals new potential biomarkers for prostate cancer diagnosis and prognosis. *Prostate.* 2014;74(12):1171–82.
221. Flori a R, Steinhoff C, Müller M, Seifert H-H, Hader C, Engers R, et al. Coordinate hypermethylation at specific genes in prostate carcinoma precedes LINE-1 hypomethylation. *Br J Cancer.* 2004 Aug 3;91(5):985–94.
222. Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA. DNA methylation and breast cancer. *Biochem Pharmacol.* 2004 Sep 15; 68(6):1187–97.
223. Leick MB, Shoff CJ, Wang EC, Congress JL, Gallicano GI. Loss of imprinting of IGF2 and the epigenetic progenitor model of cancer. *Am J Stem Cells.* 2012; 1(1):59–74.
224. Ogishima T, Shiina H, Breault JE, Tabatabai L, Bassett WW, Enokida H, et al. Increased heparanase expression is caused by promoter hypomethylation and up-regulation of transcriptional factor early growth response-1 in human prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Feb 1;11(3):1028–36.
225. Ngollo M, Dagdemir A, Karsli-Ceppioglu S, Judes G, Pajon A, Penault-Llorca F, et al. Epigenetic modifications in prostate cancer. *Epigenomics.* 2014;6(4):415–26.
226. Tokizane T, Shiina H, Igawa M, Enokida H, Urakami S, Kawakami T, et al.

- Cytochrome P450 1B1 is overexpressed and regulated by hypomethylation in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Aug 15;11(16):5793–801.
227. Yu YP, Ding Y, Chen R, Liao SG, Ren B-GG, Michalopoulos A, et al. Whole-genome methylation sequencing reveals distinct impact of differential methylations on gene transcription in prostate cancer. *Am J Pathol.* 2013 Dec;183(6):1960–70.
228. Wang Q, Williamson M, Bott S, Brookman-Amisshah N, Freeman A, Nariculam J, et al. Hypomethylation of WNT5A, CRIP1 and S100P in prostate cancer. *Oncogene.* 2007;26(45):6560–5.
229. Basu GD, Azorsa DO, Kiefer JA, Rojas AM, Tuzmen S, Barrett MT, et al. Functional evidence implicating S100P in prostate cancer progression. *Int J Cancer.* 2008;123(2):330–9.
230. Yamamoto H, Oue N, Sato A, Hasegawa Y, Yamamoto H, Matsubara A, et al. Wnt5a signaling is involved in the aggressiveness of prostate cancer and expression of metalloproteinase. *Oncogene.* 2010;29(14):2036–46.
231. Jarrard DF, Bussemakers MJG, Bova GS, Isaacs WB. Regional Loss of Imprinting of the Insulin-Like Growth Factor II Gene Occurs in Human Prostate Tissues. *Clin Cancer Res.* 1995;1(12):1471–8.
232. Turner BM. Cellular memory and the histone code. *Cell.* 2002;111(3):285–91.
233. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet.* 2005;37(4):391–400.
234. Seligson DB, Horvath S, Shi T, Yu H, Tze S, Grunstein M, et al. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature.* 2005;435(7046):1262–6.
235. Bianco-Miotto T, Chiam K, Buchanan G, Jindal S, Day TK, Thomas M, et al. Global levels of specific histone modifications and an epigenetic gene signature predict prostate cancer progression and development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(10):2611–22.
236. Haffner MC, Mosbrugger T, Esopi DM, Fedor H, Heaphy CM, Walker DA, et al. Tracking the clonal origin of lethal prostate cancer. *J Clin Invest.* 2013 Nov 1;123(11):4918–22.
237. Abeshouse A, Ahn J, Akbani R, Ally A, Amin S, Andry CD, et al. The Molecular Taxonomy of Primary Prostate Cancer. *Cell.* 2015 Nov;163(4):1011–25.
238. Grasso CS, Wu Y-M, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, et al.

- The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature*. 2012 Jul 20;487(7406):239–43.
239. Yegnasubramanian S, De Marzo AM, Nelson WG. Prostate Cancer Epigenetics: From Basic Mechanisms to Clinical Implications. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018 Jun 29;a030445.
240. Nowacka-Zawisza M, Wiśnik E. DNA methylation and histone modifications as epigenetic regulation in prostate cancer (review). *Oncol Rep*. 2017;38(5):2587–96.
241. Ropero S, Fraga MF, Ballestar E, Hamelin R, Yamamoto H, Boix-Chornet M, et al. A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition. *Nat Genet*. 2006 May; 38(5):566–9.
242. Weichert W, Röske a, Gekeler V, Beckers T, Stephan C, Jung K, et al. Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. *Br J Cancer*. 2008;98(3):604–10.
243. Baptista T, Graça I, Sousa EJ, Oliveira AI, Costa NR, Costa-Pinheiro P, et al. Regulation of histone H2A.Z expression is mediated by sirtuin 1 in prostate cancer. *Oncotarget*. 2013;4(10):1673–85.
244. Kojima K, Ohhashi R, Fujita Y, Hamada N, Akao Y, Nozawa Y, et al. A role for SIRT1 in cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 and DU145 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;373(3):423–8.
245. Abbas A, Gupta S. The role of histone deacetylases in prostate cancer. *Epigenetics*. 2008;3(6):300–9.
246. Perry AS, Watson RWG, Lawler M, Hollywood D. The epigenome as a therapeutic target in prostate cancer. *Nat Rev Urol*. 2010;7(12):668–80.
247. Jia L, Shen HC, Wantroba M, Khalid O, Liang G, Wang Q, et al. Locus-Wide Chromatin Remodeling and Enhanced Androgen Receptor-Mediated Transcription in Recurrent Prostate Tumor Cells. *Mol Cell Biol*. 2006 Oct 1;26(19):7331–41.
248. Shiota M, Yokomizo A, Masubuchi D, Tada Y, Inokuchi J, Eto M, et al. Tip60 promotes prostate cancer cell proliferation by translocation of androgen receptor into the nucleus. *Prostate*. 2009;70(5):n/a-n/a.
249. Xu K, Wu ZJ, Groner AC, He HH, Cai C, Lis RT, et al. EZH2 Oncogenic Activity in Castration-Resistant Prostate Cancer Cells Is Polycomb-Independent. *Science* (80-). 2012 Dec 14;338(6113):1465–9.

250. Karanikolas BDW, Figueiredo ML, Wu L. Comprehensive Evaluation of the Role of EZH2 in the Growth, Invasion, and Aggression of a Panel of Prostate Cancer Cell Lines. *Prostate*. 2010;70(6):675–688.
251. Hou L, Li Q, Yu Y, Li M, Zhang D. SET8 induces epithelial - mesenchymal transition and enhances prostate cancer cell metastasis by cooperating with ZEB1. 2016;1681–8.
252. Metzger E, Imhof A, Patel D, Kahl P, Hoffmeyer K, Friedrichs N, et al. Phosphorylation of histone H3T6 by PKC β I controls demethylation at histone H3K4. *Nature*. 2010 Apr 14;464(7289):792–6.
253. Wissmann M, Yin N, Müller JM, Greschik H, Fodor BD, Jenuwein T, et al. Cooperative demethylation by JMJD2C and LSD1 promotes androgen receptor-dependent gene expression. *Nat Cell Biol*. 2007;9(3):347–53.
254. Wu X, Scott H, Carlsson S V, Sjoberg DD, Cerundolo L, Lilja H, et al. Increased EZH2 expression in prostate cancer is associated with metastatic recurrence following external beam radiotherapy. *Prostate*. 2019 Jul 18;79(10):1079–89.
255. Mahajan K, Malla P, Lawrence HR, Chen Z, Kumar-Sinha C, Malik R, et al. ACK1/TNK2 Regulates Histone H4 Tyr88-phosphorylation and AR Gene Expression in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancer Cell*. 2017;31(6):790-803.e8.
256. Kaighn M, Narayan K, Ohnuki Y, Lechner J, Jones L. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). Vol. 17, *Invest Urol*. 1979. p. 16–23.
257. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, et al. LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma1. *Cancer Res Res*. 1983;43(April):1809–18.
258. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*. 2011;98(4):288–95.
259. Sandoval J, Heyn H, Moran S, Serra-Musach J, Pujana M a., Bibikova M, et al. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics*. 2011 Jun 27; 6(6):692–702.
260. Susan JCi, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res*. 1994;22(15):2990–7.
261. Amersham Pharmacia Biotech. GST Gene Fusion System. *Gene*. 1997;69:181–92.
262. Valencia AM, Oliva JL, Bodega G, Chiloeches A, López-Ruiz P, Prieto JC, et al.

- Identification of a protein-tyrosine phosphatase (SHP1) different from that associated with acid phosphatase in rat prostate. *FEBS Lett.* 1997;406(1–2):42–8.
263. Bibikova M, Lin Z, Zhou L, Chudin E, Garcia EW, Wu B, et al. High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. 2006;1–11.
264. Ladd-Acosta C, Pevsner J, Sabunciyan S, Yolken RH, Webster MJ, Dinkins T, et al. DNA methylation signatures within the human brain. *Am J Hum Genet.* 2007; 81(6):1304–15.
265. Schnekenburger M, Karius T, Diederich M, Schnekenburger M, Karius T. Regulation of epigenetic traits of the glutathione S-transferase P1 gene: From detoxification toward cancer prevention and diagnosis. *Front Pharmacol.* 2014;5(170).
266. Stresemann C, Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer.* 2008;123(1):8–13.
267. Jones P a. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 2012 Jul; 13(7):484–92.
268. Lin J, Ding L, Jin R, Zhang H, Cheng L, Qin X, et al. Four and a half LIM domains 1 (FHL1) and receptor interacting protein of 140kDa (RIP140) interact and cooperate in estrogen signaling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Jul;41(7):1613–8.
269. Zhao J-L, Liang S-Q, Fu W, Zhu B-K, Li S-Z, Han H, et al. The LIM domain protein FHL1C interacts with tight junction protein ZO-1 contributing to the epithelial–mesenchymal transition (EMT) of a breast adenocarcinoma cell line. *Gene.* 2014 Jun;542(2):182–9.
270. Zhang F, Feng F, Yang P, Li Z, You J, Xie W, et al. Four-and-a-half-LIM protein 1 down-regulates estrogen receptor α activity through repression of AKT phosphorylation in human breast cancer cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012 Feb;44(2):320–6.
271. Niu C, Liang C, Guo J, Cheng L, Zhang H, Qin X, et al. Downregulation and growth inhibitory role of FHL1 in lung cancer. *Int J Cancer.* 2012 Jun 1;130(11):2549–56.
272. Balamurugan K, Sterneck E. The many faces of C/EBP δ and their relevance for inflammation and cancer. *Int J Biol Sci.* 2013;9(9):917–33.
273. Ko C-Y, Hsu H-C, Shen M-R, Chang W-C, Wang J-M. Epigenetic Silencing of CCAAT/Enhancer-binding Protein δ Activity by YY1/Polycomb Group/DNA

- Methyltransferase Complex. *J Biol Chem*. 2008 Nov 7;283(45):30919–32.
274. TIAN Y, HUANG C, ZHANG H, NI Q, HAN S, WANG D, et al. CDCA7L promotes hepatocellular carcinoma progression by regulating the cell cycle. *Int J Oncol*. 2013 Dec;43(6):2082–90.
275. Wu C, Guan Q, Wang Y, Zhao ZJ, Zhou GW. SHP-1 Suppresses Cancer Cell Growth by Promoting Degradation of JAK Kinases. *J Cell Biochem*. 2003;90(5):1026–37.
276. Jiao H, Berrada K, Yang W, Tabrizi M, Plataniias LC, Yi T. Direct Association with and Dephosphorylation of Jak2 Kinase by the SH2-Domain-Containing Protein Tyrosine Phosphatase SHP-1. *Mol Cell Biol*. 1996; 16(12):6985–92.
277. Craft N, Shostak Y, Carey M, Sawyers CL. A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nat Med*. 1999;5(3):280–5.
278. KOU X, CHEN N, FENG Z, LUO L, YIN Z. GSTP1 negatively regulates Stat3 activation in epidermal growth factor signaling. *Oncol Lett*. 2013 Mar; 5(3):1053–7.
279. Kwon EM, Holt SK, Fu R, Kolb S, Williams G, Stanford JL, et al. Androgen metabolism and JAK/STAT pathway genes and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol*. 2012;36(4):347–53.
280. Balakrishnan A, Guruprasad KP, Satyamoorthy K, Joshi MB. Interleukin-6 determines protein stabilization of DNA methyltransferases and alters DNA promoter methylation of genes associated with insulin signaling and angiogenesis. *Lab Investig*. 2018 Sep 28;98(9):1143–58.
281. He J, Zhang Y. Janus kinase 2: an epigenetic “writer” that activates leukemogenic genes. *J Mol Cell Biol*. 2010 Oct;2(5):231–3.
282. Son H-J, Kim J-Y, Hahn Y, Seo S-B. Negative regulation of JAK2 by H3K9 methyltransferase G9a in leukemia. *Mol Cell Biol*. 2012 Sep; 32(18):3681–94.
283. Jeong JJ, Gu X, Nie J, Sundaravel S, Liu H, Kuo W-L, et al. Cytokine regulated phosphorylation and activation of TET2 by JAK2 in hematopoiesis. *Cancer Discov*. 2019 Apr 3;CD-18-1138.
284. Gelmetti V, Zhang J, Fanelli M, Minucci S, Pelicci PG, Lazar M a. Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO. *Mol Cell Biol*. 1998;18(12):7185–91.
285. Wang J, Hoshino T, Redner RL, Kajigaya S, Liu JM. ETO, fusion partner in

- t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(18):10860–5.
286. Liu S, Shen T, Huynh L, Klisovic MI, Rush LJ, Ford JL, et al. Interplay of RUNX1/MTG8 and DNA Methyltransferase 1 in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Res*. 2005 Feb 15;65(4):1277–84.
287. Alfayez M, Vishnubalaji R, Alajez NM. Runt-related Transcription Factor 1 (RUNX1T1) Suppresses Colorectal Cancer Cells Through Regulation of Cell Proliferation and Chemotherapeutic Drug Resistance. *Anticancer Res*. 2016 Oct 12;36(10):5257–64.
288. Lam K, Zhang D-E. RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2012;17:1120–39.
289. Tonks A, Pearn L, Mills KI, Burnett AK, Darley RL. The sensitivity of human cells expressing RUNX1-RUNX1T1 to chemotherapeutic agents. *Leukemia*. 2006 Oct 17;20(10):1883–5.
290. Tonks a, Pearn L, Musson M, Gilkes A, Mills KI, Burnett a K, et al. Transcriptional dysregulation mediated by RUNX1-RUNX1T1 in normal human progenitor cells and in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2007;21(12):2495–505.
291. Yan M, Burel SA, Peterson LF, Kanbe E, Iwasaki H, Boyapati A, et al. Deletion of an AML1-ETO C-terminal NcoR/SMRT-interacting region strongly induces leukemia development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(49):17186–91.
292. Blyth K, Cameron ER, Neil JC. The RUNX genes: Gain or loss of function in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(5):376–87.
293. Zhou Q, Deng C, Li Z, Chen J, Yao K, Huang K, et al. Molecular characterization and integrative genomic analysis of a panel of newly established penile cancer cell lines. *Cell Death Dis*. 2018 Jun 7;9(6):684.
294. Yeh K-T, Chen T-H, Yang H-W, Chou J-L, Chen L-Y, Yeh C-M, et al. Aberrant TGFβ/SMAD4 signaling contributes to epigenetic silencing of a putative tumor suppressor, RunX1T1 in ovarian cancer. *Epigenetics*. 2011 Jun 27;6(6):727–39.
295. Nakayama M, Bennett CJ, Hicks JL, Epstein JI, Platz EA, Nelson WG, et al. Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture micr. *Am J Pathol*. 2003;163(3):923–33.

296. Maldonado L, Brait M, Loyo M, Sullenberger L, Wang K, Peskoe SB, et al. GSTP1 promoter methylation is associated with recurrence in early stage prostate cancer. *J Urol*. 2014;192(5):1542–8.
297. Nelson CP, Kidd LC, Sauvageot J, Isaacs WB, De Marzo AM, Groopman JD, et al. Protection against 2-hydroxyamino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine cytotoxicity and DNA adduct formation in human prostate by glutathione S-transferase P1. *Cancer Res*. 2001 Jan 1;61(1):103–9.
298. Lovrić E, Gatalica Z, Eyzaguirre E, Krušlin B. Expression of Maspin and Glutathione-S-Transferase- π in Normal Human Prostate and Prostatic Carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2010 May; 18(5):1.
299. Ruzza P, Rosato A, Rossi CR, Floreani M, Quintieri L. Glutathione transferases as targets for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem*. 2009;9(7):763–77.
300. Kanwal R, Pandey M, Bhaskaran N, Maclennan GT, Fu P, Ponsky LE, et al. Protection against oxidative DNA damage and stress in human prostate by glutathione S-transferase P1. *Mol Carcinog*. 2014;53(1):8–18.
301. Bellone G, Silvestri S, Artusio E, Tibaudi D, Turletti A, Geuna M, et al. Growth stimulation of colorectal carcinoma cells via the c-kit receptor is inhibited by TGF- β 1. *J Cell Physiol*. 1997 Jul;172(1):1–11.
302. Lennartsson J, Ronnstrand L. Stem Cell Factor Receptor/c-Kit: From Basic Science to Clinical Implications. *Physiol Rev*. 2012;92(4):1619–49.
303. Abbaspour Babaei M, Kamalidehghan B, Saleem M, Zaman Huri H, Ahmadipour F. Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells. *Drug Des Devel Ther*. 2016 Aug;Volume 10:2443–59.
304. Lorenz U, Bergemann AD, Steinberg HN, Flanagan JG, Li X, Galli SJ, et al. Genetic analysis reveals cell type-specific regulation of receptor tyrosine kinase c-Kit by the protein tyrosine phosphatase SHP1. *J Exp Med*. 1996 Sep 1;184(3):1111–26.
305. Kozlowski M, Larose L, Lee F, Le DM, Rottapel R, Siminovitch K a. SHP-1 binds and negatively modulates the c-Kit receptor by interaction with tyrosine 569 in the c-Kit juxtamembrane domain. *Mol Cell Biol*. 1998 Apr;18(4):2089–99.
306. Raghav PK, Singh AK, Gangenahalli G. A change in structural integrity of c-Kit mutant D816V causes constitutive signaling. *Mutat Res Mol Mech Mutagen*. 2018 Mar;808:28–38.
307. Meng Z, Wang D-M, Li Y-H, Liu X, Guo S-Q, Luo J-M. [Demethylation effect of inhibitor As2O3 on expression of SHP-1 and C-kit genes in leukemia HL-60

- cells]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi*. 2013 Jun; 21(3):613–6.
308. RAMJI DP, FOKA P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J*. 2002 Aug 1;365(3):561–75.
309. Ko C, Chang W, Wang J. Biological roles of CCAAT/Enhancer-binding protein delta during inflammation. *J Biomed Sci*. 2015;22(1):6.
310. Wang Y-H, Wu W-J, Wang W-J, Huang H-Y, Li W-M, Yeh B-W, et al. *CEBPD* amplification and overexpression in urothelial carcinoma: a driver of tumor metastasis indicating adverse prognosis. *Oncotarget*. 2015 Oct 13;6(31):31069–84.
311. Ikezoe T, Gery S, Yin D, O’Kelly J, Binderup L, Lemp N, et al. CCAAT/enhancer-binding protein delta: a molecular target of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in androgen-responsive prostate cancer LNCaP cells. *Cancer Res*. 2005;65(26):4762–8.
312. Thangaraju M, Rudelius M, Bierie B, Raffeld M, Sharan S, Hennighausen L, et al. C/EBPdelta is a crucial regulator of pro-apoptotic gene expression during mammary gland involution. *Development*. 2005 Nov 28;132(21):4675–85.
313. Pan YC, Li CF, Ko CY, Pan MH, Chen PJ, Tseng JT, et al. CEBPD reverses RB/E2F1-mediated gene repression and participates in HMDB-induced apoptosis of cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2010;16(23):5770–80.
314. Chuang C-H, Wang W-J, Li C-F, Ko C-Y, Chou Y-H, Chuu C-P, et al. The combination of the prodrugs perforin-CEBPD and perforin-granzyme B efficiently enhances the activation of caspase signaling and kills prostate cancer. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1220.
315. Yang Q, Jiang W, Hou P. Emerging role of PI3K/AKT in tumor-related epigenetic regulation. *Semin Cancer Biol*. 2019 Dec;59(April):112–24.
316. Groner B, von Manstein V. Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Aug;451:1–14.
317. Contreras PS, Gonzalez-Zuñiga M, González-Hódar L, Yáñez MJ, Dulcey A, Marugan J, et al. Neuronal gene repression in Niemann-Pick type C models is mediated by the c-Abl/HDAC2 signaling pathway. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*. 2016 Feb;1859(2):269–79.
318. Segré C V., Chiocca S. Regulating the Regulators: The Post-Translational Code of Class I HDAC1 and HDAC2. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:1–15.
319. Hanigan TW, Taha TY, Aboukhatwa SM, Frasor J, Petukhov PA. Scaffold dependent histone deacetylase (HDAC) inhibitor induced re-equilibration of the

- subcellular localization and post-translational modification state of class I HDACs. Balusu R, editor. PLoS One. 2017 Oct 18;12(10):e0186620.
320. Paroni G, Cernotta N, Dello Russo C, Gallinari P, Pallaoro M, Foti C, et al. PP2A Regulates HDAC4 Nuclear Import. *Mol Biol Cell*. 2007;19(1):655–67.
321. Sun J-M, Chen HY, Davie JR. Differential Distribution of Unmodified and Phosphorylated Histone Deacetylase 2 in Chromatin. *J Biol Chem*. 2007 Nov 9;282(45):33227–36.
322. Sengupta N, Seto E. Regulation of histone deacetylase activities. *J Cell Biochem*. 2004;93(1):57–67.
323. De Castro IJ, Budzak J, Di Giacinto ML, Ligammari L, Gokhan E, Spanos C, et al. Repo-Man/PP1 regulates heterochromatin formation in interphase. *Nat Commun*. 2017;8.
324. Nuytten M, Beke L, Van Eynde A, Ceulemans H, Beullens M, Van Hummelen P, et al. The transcriptional repressor NIPP1 is an essential player in EZH2-mediated gene silencing. *Oncogene*. 2008;27(10):1449–60.
325. De Castro IJ, Amin HA, Vinciotti V, Vagnarelli P. Network of phosphatases and HDAC complexes at repressed chromatin. *Cell Cycle*. 2017;16(21):2011–7.
326. Joo MK, Park J-JJ, Yoo HS, Lee BJ, Chun HJ, Lee SW, et al. Epigenetic regulation and anti-tumorigenic effects of SH2-containing protein tyrosine phosphatase 1 (SHP1) in human gastric cancer cells. *Tumor Biol*. 2016 Apr 27;37(4):4603–12.
327. Oka T, Ouchida M, Koyama M, Ogama Y, Takada S, Nakatani Y, et al. Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP1 gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas. *Cancer Res*. 2002 Nov 15;62(22):6390–4.
328. Tai WT, Shiau CW, Chen PJ, Chu PY, Huang HP, Liu CY, et al. Discovery of novel src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 agonists from sorafenib for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2014;59(1):190–201.
329. Gery S, Tanosaki S, Hofmann W, Koppel A, Koeffler HP. C/EBP δ expression in a BCR-ABL-positive cell line induces growth arrest and myeloid differentiation. *Oncogene*. 2005 Feb 10;24(9):1589–97.
330. Seo D-W, Li H, Qu C-K, Oh J, Kim Y-S, Diaz T, et al. Shp-1 Mediates the Antiproliferative Activity of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-2 in Human Microvascular Endothelial Cells. *J Biol Chem*. 2006 Feb 10;281(6):3711–21.
331. Pagès P, Benali N, Saint-Laurent N, Estève JP, Schally A V., Tkaczuk J, et al.

sst2 somatostatin receptor mediates cell cycle arrest and induction of p27(Kip1).
Evidence for the role of SHP-1. J Biol Chem. 1999 May 21;274(21):15186–93.