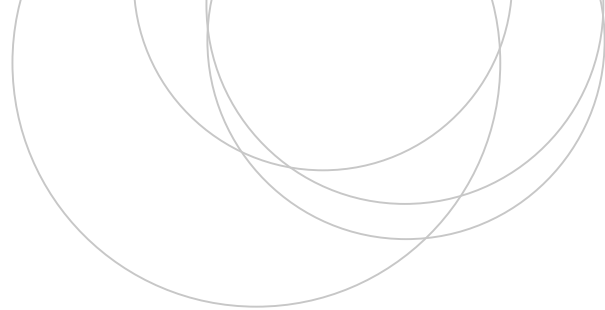




Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

ZIENTZIA  
ETA TEKNOLOGIA  
FAKULTATEA  
FACULTAD  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Trabajo de Fin de Grado  
GRADO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

# Papel regulador del factor de transcripción MITFA en el cáncer de próstata metastásico

**Autor/a:**

Mikel Pujana Vaquerizo

**Director/a y Codirector/a:**

Arkaitz Carracedo/Verónica Torrano

Leioa, 26 de junio de 2017



# Índice

<b>1-Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>2-Hipótesis y objetivos</b> .....	<b>2</b>
<b>3-Materiales y métodos</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1 Cultivo celular</b> .....	3
3.1.1 Línea celular PC3 .....	3
3.1.2 Protocolo general de cultivos .....	4
<b>3.2 Ensayos celulares</b> .....	5
3.2.1 Crecimiento celular: Tinción con cristal violeta .....	5
3.2.2 Crecimiento independiente de anclaje: Agar blando .....	5
<b>3.3 Ensayos moleculares</b> .....	6
3.3.1 Extracción de ARN .....	6
3.3.2 PCR cuantitativa .....	6
3.3.3 Extracción y cuantificación de proteína .....	6
3.3.4 Electroforesis y western blot .....	7
<b>3.4 Análisis estadístico</b> .....	8
<b>4-Resultados</b> .....	<b>8</b>
<b>4.1 Diseño y validación de herramientas de modulación de la expresión de MITFA</b> .. 8	
4.1.1 El tratamiento con doxiciclina induce la expresión de MITFA a nivel de ARN mensajero (ARNm) en las células PC3 TRIPZ-MITFA .....	8
4.1.2 El tratamiento con doxiciclina induce un incremento de los niveles de MITFA a nivel proteico .....	10
<b>4.2 Análisis del efecto biológico de la modulación de MITFA</b> .....	11
4.2.1 La expresión de MITFA reduce el número de células PC3 en crecimiento .....	11
4.2.2 La expresión de MITFA disminuye la capacidad de formación de colonias de las células PC3.....	12
<b>5-Discusión</b> .....	<b>13</b>
<b>6-Conclusiones y visión de futuro</b> .....	<b>14</b>
<b>7-Bibliografía</b> .....	<b>15</b>



---

## Resumen

El cáncer de próstata (CaP) es uno de los cánceres con mayor incidencia entre los hombres a nivel mundial. El desarrollo de metástasis muestra un grave problema para la salud ya que el pronóstico se torna muy desfavorable y el tratamiento actual es limitado. La investigación en curso trata de entender la agresividad en el cáncer de próstata avanzado y elucidar a nivel molecular sus mecanismos de acción. La reciente caracterización del regulador metabólico PGC1 $\alpha$  como supresor de tumores en cáncer de próstata<sup>1,2</sup> ha permitido describir parcialmente este mecanismo, pero es necesario definir un programa celular más específico para poder desarrollar terapias individuales. En este contexto, la identificación del factor de transcripción MITF pretende arrojar más luz en este camino y su caracterización nos lleva a plantearnos su papel como supresor de tumores en esta enfermedad.

Palabras clave: CaP, PGC1 $\alpha$ , MITF

---



## 1- Introducción

El cáncer de próstata es, a nivel mundial, el segundo cáncer con mayor tasa de mortalidad en la población masculina. Además, en la Unión Europea, es el cáncer con mayor incidencia entre los hombres<sup>3</sup>. En la mayoría de los casos presenta buen pronóstico siendo suficiente una prostatectomía en lesiones localizadas (en combinación o no con radioterapia) para curar la enfermedad. Sin embargo, existe un grupo reducido de pacientes, aproximadamente el 15 %, que recae en la enfermedad, lo cual se determina mediante el aumento de los niveles del PSA (antígeno prostático específico), denominado por ello recidiva bioquímica. El pronóstico de este grupo de pacientes es muy desfavorable y, en muchos casos, tras una respuesta pobre a los tratamientos actuales (típicamente inhibición de la producción o señalización de andrógenos), se acaba desarrollando CaP resistente a la castración (CRPC)<sup>3,4</sup>. Este último es un cáncer muy agresivo y altamente metastásico por lo que es importante caracterizar a nivel molecular los mecanismos implicados en el desarrollo de este fenotipo.

Trabajos previos del grupo dirigido por el Dr. Arkaitz Carracedo han combinado la biología computacional, tecnologías de alto rendimiento (*high throughput analysis* o técnicas OMICas) y manipulaciones *in vivo* para proporcionar un nuevo punto de vista acerca de los mecanismos moleculares que determinan la agresividad en CaP<sup>3</sup>. En este contexto, han identificado el co-regulador metabólico PGC1 $\alpha$ , el cual aparece reprimido en CaP, como un supresor de metástasis, además de estar asociada su baja expresión con un peor pronóstico de la enfermedad<sup>1,2</sup>. Así, el estudio de la expresión de PGC1 $\alpha$ , pretende proporcionar futuras herramientas necesarias para estratificar y desarrollar terapias más específicas contra el CaP<sup>1</sup>.

Caracterizado el papel funcional de PGC1 $\alpha$  como supresor de tumores en CaP, el objetivo actual es analizar los mediadores de sus efectos biológicos y la razón de su baja expresión en la enfermedad. Entre las hipótesis más plausibles se encuentran las alteraciones en factores de transcripción, cambios epigenéticos en el promotor y alteraciones propias del ADN que podrían perturbar la expresión de PGC1 $\alpha$ <sup>1</sup>. Para ello, inicialmente se realizaron análisis de correlación génica entre PGC1 $\alpha$  y sus reguladores transcripcionales en diversas bases de datos públicas de CaP. El empleo de herramientas bioinformáticas existentes en el laboratorio, permitió hallar el factor de transcripción MITF (Microphthalmia-Associated Transcription Factor) como el mejor candidato a regular la

expresión de PGC1 $\alpha$  en CaP, ya que presenta un perfil consistente de co-regulación directa con PGC1 $\alpha$  y sus niveles se encuentran alterados en la enfermedad.

MITF es una proteína con un dominio hélice-bucle-hélice básico de cremallera de leucina. Existen 8 isoformas diferentes de esta proteína y reconocen específicamente secuencias E-boxes (CAYRTG) y M-boxes (TCAYRTG o CAYRTGA) en los promotores de sus genes diana<sup>5</sup>. Este factor de transcripción regula la expresión de múltiples genes relacionados con la proliferación, supervivencia y crecimiento celular. De este modo, muestra un papel clave en la diferenciación, donde algunos tipos celulares necesitan comportamientos invasivos para llegar al tejido de destino y despojarse de su fenotipo mesenquimal<sup>6</sup>. Este sería el caso de los melanocitos y, por ello, la implicación de MITF ha sido profundamente estudiada en el melanoma maligno, donde mayoritariamente prevalece la isoforma M<sup>7</sup>. Sin embargo, si bien es cierto que la presencia de MITF es necesaria en la diferenciación de éstas células, su sobre-expresión en combinación con otras mutaciones se asocia a propiedades oncogénicas en melanoma. Además, algunos estudios han demostrado que MITFM regula los niveles de PGC1 $\alpha$  en este cáncer y es responsable a su vez del efecto biológico<sup>8,9</sup>. De este modo, el programa transcripcional formado por el eje MITFM-PGC1 $\alpha$  en melanoma está asociado a propiedades oncogénicas<sup>9</sup>.

Por el contrario, la consistente y progresiva pérdida de MITF en el desarrollo del CaP y la co-regulación directa que presenta con PGC1 $\alpha$ , nos lleva a plantearnos su papel como supresor de tumores en este cáncer. Además, estudios bioinformáticos y experimentales realizados previamente por el laboratorio, indican que la isoforma A es la más prevalente en el cáncer de próstata. Asimismo, la bibliografía existente en melanoma nos lleva a hipotetizar sobre la posible importancia de MITF en la función de PGC1 $\alpha$ .

## **2- Hipótesis y objetivos**

La progresiva pérdida de expresión que presenta la isoforma A del factor de transcripción MITF (de ahora en adelante referida a MITFA) en el desarrollo tumoral del cáncer de próstata y el perfil correlativo hallado con el co-regulador metabólico PGC1 $\alpha$ , indican la posible implicación de MITFA como supresor de tumores en esta enfermedad.



Basándonos en estos datos preliminares, se han fijado los siguientes objetivos:

- Diseñar y validar herramientas que nos permitan modular los niveles de expresión de MITFA en líneas celulares de CaP.
- Analizar consecuentemente los efectos biológicos de su modulación.

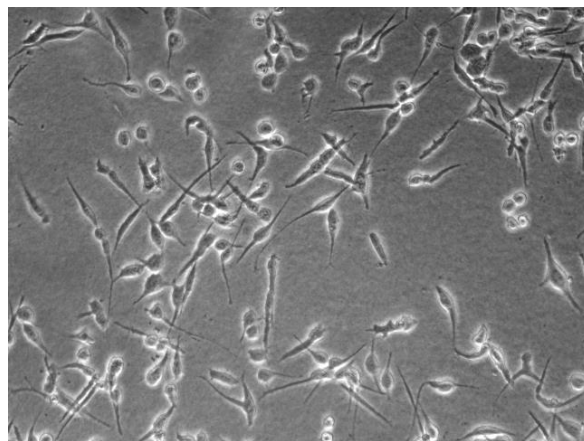
### 3- Materiales y métodos

#### 3.1 Cultivo celular

##### 3.1.1 Línea celular PC3

En esta investigación se ha empleado la línea celular PC3. Estas células son muy adecuadas para analizar los cambios bioquímicos observados en etapas metastásicas de la enfermedad, así como para comprobar la eficacia de diferentes fármacos. Las células PC3 se establecieron en el año 1979 de una metástasis ósea de un hombre caucásico de 62 años con cáncer de próstata en grado IV<sup>10</sup>. Estas células se han obtenido de la *Leibniz-Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* y presentan una morfología epitelial y un crecimiento adherente.

Para la generación de la línea celular estable con expresión inducida de MITFA, se ha empleado el sistema lentiviral TRIPZ inducible por doxiciclina (Thermo Scientific). De este modo, se han transducido las células PC3 con el vector TRIPZ que contiene la secuencia del gen de fusión HA-MITFA (Influenza hemagglutinin-MITFA).



**Figura 1. Células PC3 24 horas después de la siembra.** Crecimiento en medio DMEM, con 10 % de suero fetal bovino y 1 % de penicilina-estreptomicina. Se muestra la morfología de las células. Imagen obtenida por microscopio óptico. (10x)

### 3.1.2 Protocolo general de cultivos

Las células PC3 se cultivaron en el medio completo DMEM el cual contiene un 10 % de Suero Fetal Bovino (FBS) y un 1 % de penicilina-estreptomicina. El manejo y crecimiento del cultivo celular se realizó en condiciones estériles, en campanas de flujo laminar (Faster Bio48) y en incubadoras (Hera Cell 150) en condiciones de normoxia (21 % O<sub>2</sub>), a 37 °C y una saturación de CO<sub>2</sub> del 5 %.

Los pases celulares se realizaron en concordancia a la comprobación previa por microscopio (Olympus CKX31) de la confluencia y nivel de estrés del cultivo. De una manera protocolaria, en primer lugar se absorbió el medio de cultivo de las placas, se lavaron las células con abundante Tampón Fosfato Salino (PBS) pre-atemperado, se añadió 1 ml de tripsina y se incubó durante 5 minutos a 37 °C. De esta manera, las células se levantaron de las placas de cultivo. Para la inactivación de la tripsina, se añadieron 9 ml de medio completo a las placas y se realizaron las diluciones necesarias colocando las células en nuevas placas p100.

Para la congelación de las líneas celulares, tras la inactivación de la tripsina, la suspensión celular se centrifugó, y tras la absorción del sobrenadante, los pellets celulares se resuspendieron en 1 ml de medio de congelación cuya composición es 90 % de FBS y 10 % de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich). Finalmente, los crioviales se sometieron a una congelación progresiva para su posterior almacenaje en nitrógeno líquido.

Cuando se necesitaron descongelar líneas celulares, los crioviales se sumergieron en un baño a 37.2 °C y tras la descongelación, la suspensión celular se añadió directamente en la placa de cultivo p100 con 10-15 ml de medio completo.

Por último, la siembra de experimentos para ensayos celulares y moleculares se realizó en presencia y ausencia de doxiciclina (0.5 µg/ml) y por triplicados técnicos de cada condición. El conteo celular se llevó a cabo en cámaras Neubauer (Marienfeld) empleando 10 µl de una mezcla de células y azul Tripán en ratio 1:1. Esta tinción con azul Tripán permitió observar por microscopio la proporción de células vivas/muertas.

## **3.2 Ensayos celulares**

### **3.2.1 Crecimiento celular: Tinción con cristal violeta**

Para analizar el crecimiento en número que presentan las células PC3 TRIPZ-MITFA a diferentes tiempos (día 0, 3 y 6), se sembraron 5.000 células por pocillo (por triplicado) y por cada condición (no dox, dox) en placas p12 y en el volumen final de 1 ml por pocillo. Para la fijación celular, se absorbió el medio de cultivo, se lavó con PBS y se añadió formalina al 10 %.

Una vez fijado el último día de la curva de crecimiento, para teñir las células, se absorbió la formalina y tras un lavado con abundante PBS, se añadió el cristal violeta (0.1 % cristal violeta y 20 % metanol) en cada pocillo. Se incubó durante al menos 30 minutos y se mantuvieron las placas en movimiento. Por último, se absorbió el cristal violeta, se lavaron las placas con abundante agua y se dejaron secar completamente. El procesamiento se llevó a cabo añadiendo 1 ml de ácido acético al 10 % en cada pocillo, para su posterior análisis de la absorbancia a 595 nm.

### **3.2.2 Crecimiento independiente de anclaje: Agar blando**

El análisis de la capacidad de las células PC3 TRIPZ-MITFA para formar colonias independientes de anclaje se llevó a cabo en placas p6. Paralelamente, se sembró la misma cantidad de células en condiciones adherentes durante 12-24 h, para poder normalizar los datos obtenidos del agar blando con el número de células el día de siembra. Se analizaron las condiciones no dox/ dox y por triplicado técnico.

Las placas p6 se prepararon con dos capas de agar a diferentes concentraciones. En la parte inferior se añadieron 3 ml de una mezcla de medio completo precalentado y agar al 3 % y se incubó durante al menos 1 hora a 4 °C para su solidificación. La parte superior se preparó con 1 ml de una mezcla de agar de bajo punto de fusión (low melting), medio precalentado y las células no inducidas e inducidas PC3 TRIPZ-MITFA (5000 células por pocillo). Finalmente, se dejó solidificar la placa durante 1 hora a 4 °C. Las colonias se dejaron crecer en la incubadora durante 1-2 semanas, tras las cuales se analizaron los resultados.

### **3.3 Ensayos moleculares**

#### **3.3.1 Extracción de ARN**

La extracción de ARN se llevó a cabo en placas p6 sobre las que se sembraron 75.000-100.000 células no inducidas e inducidas PC3 TRIPZ-MITFA en un volumen final de 2 ml.

Tras una incubación de 48-72 h, se absorbió el medio, se lavó con PBS y se extrajo el ARN mediante el kit de extracción *Nucleospin*. Este protocolo se basa en el aislamiento del ARN en columnas de filtración. El ARN extraído se cuantificó con el *Nanodrop ND-1000 spectrophotometer* y posteriormente se sintetizó el cADN a partir de 1 µg de ARN usando la enzima transcriptasa reversa (ThermoFisher SuperScript I5).

#### **3.3.2 PCR cuantitativa**

El cADN se diluyó en una proporción 1:3 y se cargó 1 µl de cada muestra (por triplicado) en una placa de 384 pocillos. El cADN se combinó con 5 µl de una mezcla que contiene: máster mix universal Taqman, los cebadores (directo y reverso, 20 µM), las sondas fluorescentes y agua (dH<sub>2</sub>O). Se analizaron los genes MITFA y CRYAB y se empleó como control de la expresión endógena el gen GAPDH.

El modelo de PCR cuantitativa empleada se basa en el sistema Taqman clásico donde a una reacción de PCR con dos cebadores se le añade un tercero que se incorpora en el proceso de amplificación. La incorporación de este tercer cebador, produce la emisión de fluorescencia. Esta fluorescencia es captada y cuantificada por un termociclador específico a lo largo de cada ciclo de amplificación. A partir de los datos obtenidos se pudo observar un comportamiento sigmoideo en la emisión de fluorescencia. Tomando estas gráficas se estableció la línea de corte para el análisis en la fracción lineal de la amplificación para todas las reacciones, y se analizó la diferencia de ciclos de amplificación en cada muestra.

#### **3.3.3 Extracción y cuantificación de proteína**

La extracción de proteína se llevó a cabo en placas p6 sobre las que se sembraron 75.000-100.000 células en un volumen final de 2 ml.

Tras una incubación de 48-72 h, se absorbió el medio, se realizó un lavado con PBS y se extrajo la proteína mediante lisis utilizando el buffer RIPA (casero). La cuantificación de proteína se realizó siguiendo el protocolo *Pierce<sup>™</sup> BCA protein Assay Kit*. Para ello, se analizó la absorbancia medida a 562 nm en referencia a una recta patrón de albúmina de suero bovina (BSA) (2 mg/ml) de concentración conocida.

### **3.3.4 Electroforesis y Western Blot**

Tras la adición de Laemmli 5x (casero) y agua (dH<sub>2</sub>O) a cada muestra cuantificada (con el objetivo de cargar la misma concentración de proteína en todas las calles), las proteínas se separaron según su tamaño molecular en un gel de poliacrilamida. Se empleó un sistema precast de geles (Nupage, Invitrogen): estos geles contienen un gradiente de porcentajes de acrilamida que permite separar correctamente las proteínas tanto de bajo como las de alto peso molecular. Se cargaron 10 µg de proteína de cada muestra y el marcador empleado para la determinación del peso molecular de las bandas fue de la casa Nippon. La electroforesis se llevó a cabo durante 1 hora a un voltaje de 180 V.

Para la transferencia de las proteínas del gel se empleó el sistema húmedo de transferencia a una membrana de nitrocelulosa sobre la que colocamos nuestro gel y realizamos un sándwich con membranas whatman y esponjas. La transferencia se realizó durante 1-2 h a 80-100 V. Posteriormente se bloquearon las membranas con TBST al 5 % de leche durante 1 h y en agitación. Tras el bloqueo, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios durante 16 h (toda la noche) a 4 °C y en agitación. Se analizó la expresión de las proteínas HA-MITF (72 KDa), p-AKT (60 KDa) y la proteína GAPDH (36-37 KDa) como control de carga. Los anticuerpos empleados fueron, anti HA (dilución 1:5000), anti p-AKT (dilución 1:1000) y anti GAPDH (dilución 1:1000), todos de origen de conejo.

Tras la incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBST, y se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios diluidos en un 5 % de leche (dilución 1:5000, Jackson Immunoresearch) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras esta incubación, las membranas se lavaron 3 veces con TBST durante 10 minutos cada una. El revelado de las membranas se realizó mediante la incubación con el sustrato de la peroxidasa de los anticuerpos secundarios y su posterior revelación en films.

### 3.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha llevado a cabo con el programa Graphpad prism 6.0, habiendo realizado 3 réplicas biológicas para cada experimento. Se asume normalidad en la distribución de los datos. De esta manera, se ha realizado un estudio de t-student (*one sample t-student*) donde se han fijado valores estadísticamente significativos con un valor  $p < 0.05$ .

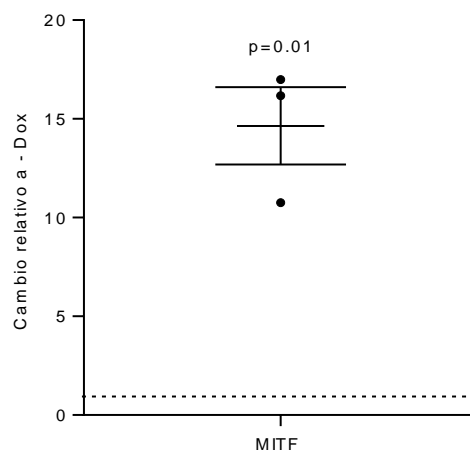
## 4- Resultados

### 4.1 Diseño y validación de herramientas de modulación de la expresión de MITFA

#### **4.1.1 El tratamiento con doxiciclina induce la expresión de MITFA a nivel de ARN mensajero (ARNm) en las células PC3 TRIPZ-MITFA.**

Para validar la modulación de la expresión de MITFA en las células PC3 TRIPZ-MITFA mediante el tratamiento con doxiciclina, se analizaron los niveles de ARNm de MITF en presencia y ausencia de doxiciclina.

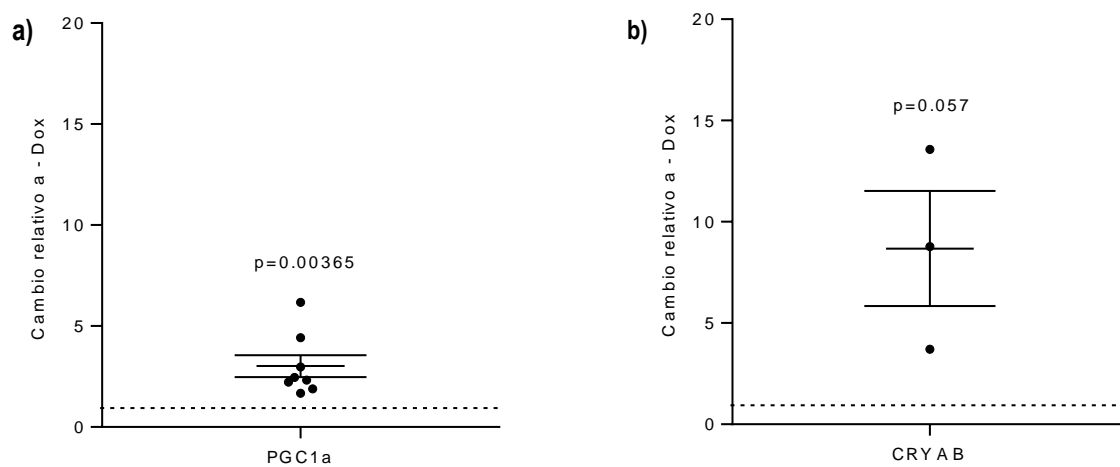
Como se observa en la figura número dos, la inducción con doxiciclina de las células PC3 TRIPZ-MITFA, aumenta de una manera estadísticamente significativa ( $p = 0.01$ ) los niveles de ARNm de MITF.



**Figura 2. El tratamiento crónico de las células PC3 con doxiciclina induce un aumento de los niveles de ARNm de MITF.** Representación gráfica del cambio relativo de la expresión de MITF tras el tratamiento con doxiciclina respecto al control (-Dox). Los valores estadísticamente significativos se han fijado en  $p < 0.05$  y el número de experimentos biológicos realizados ha sido de 3. Las barras de error muestran la desviación estándar de la media.

Por otro lado, para evaluar la funcionalidad de la isoforma sobreexpresada, se muestra el efecto de la modulación de MITF en los niveles de expresión de PGC1 $\alpha$  (acorde a los resultados experimentales previos del laboratorio) (Figura 3). Del mismo modo, el laboratorio realizó un microarray simultaneo a la caracterización de MITFA, en el que se identificó CRYAB como gen diana importante de MITFA en cáncer de próstata. Por ello, se muestra también el efecto de la modulación de MITFA en la expresión de CRYAB (Figura 3).

Analizando los resultados, se puede observar como la sobreexpresión de MITFA tiene un efecto de regulación sobre los niveles de expresión de PGC1 $\alpha$  y CRYAB (Figura 3). Sin embargo, la expresión del ARNm de CRYAB no cambia de una manera estadísticamente significativa ( $p = 0.057$ ) por lo que habría que realizar más experimentos. Asimismo, los niveles de expresión de PGC1 $\alpha$  a nivel del ARNm cambian de manera significativa con la sobreexpresión de MITFA ( $p= 0.00365$ )

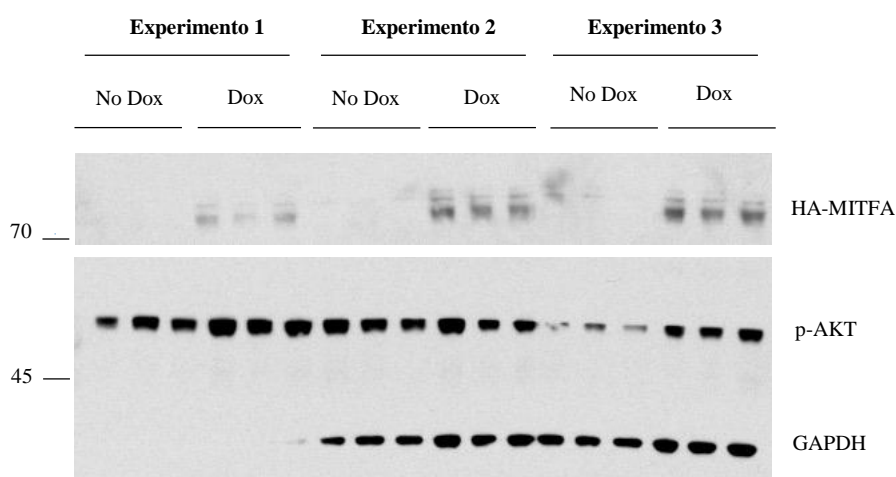


**Figura 3. El aumento de la expresión de MITFA regula los niveles de ARNm del co-regulador metabólico PGC1 $\alpha$  y de CRYAB.** Representación gráfica del cambio relativo respecto al control tras la expresión de MITFA con doxiciclina. a) El aumento de los niveles de ARNm de MITFA tiene un efecto estadísticamente significativo sobre los niveles de expresión de PGC1 $\alpha$ . (Resultados previos del laboratorio). b) El aumento de los niveles de ARNm de MITFA muestran un efecto de modulación en la expresión de CRYAB, pero el valor p no es estadísticamente significativo. Las barras de error muestran la desviación estándar de la media.

#### 4.1.2 El tratamiento con doxíciclina induce un incremento de los niveles de MITFA a nivel proteico.

El análisis del efecto del tratamiento con doxíciclina de las células PC3 TRIPZ-MITFA en la modulación de los niveles de la proteína MITFA se realizó mediante la técnica de Western Blot.

El análisis de las bandas del gel muestra cómo el tratamiento con doxíciclina induce altos niveles de MITFA con respecto al control (No dox) (Figura 4). El anticuerpo primario utilizado para la detección, anti-HA, reconoce específicamente el producto de la expresión de la secuencia nucleotídica del gen de fusión HA-MITFA en el plásmido de las células (inducible por doxíciclina), de tal modo que los niveles proteicos de MITF detectados pertenecen sólo a la isoforma A. Respecto al marcador de proliferación celular p-AKT, no se han podido argumentar resultados relevantes debido a la alta variabilidad intra e inter experimental mostrada y debido a la falta de detección de la proteína total.



**Figura 4. El tratamiento crónico con doxíciclina aumenta los niveles de MITFA a nivel proteico.** El análisis de las bandas del Western Blot muestra cómo el tratamiento con doxíciclina aumenta los niveles de MITFA, con la aparición de una banda de unos 72 KDa en la condición +Dox. Se ha empleado el GAPDH como control de carga.

Los resultados obtenidos tanto a nivel de ARNm como a nivel proteico muestran la eficacia del sistema de expresión de MITFA generado en las células PC3. De este modo, queda validada la herramienta de análisis y podemos concluir que los efectos biológicos observados en los experimentos celulares se deberán mayoritariamente a la inducción del factor de transcripción MITFA en las células PC3.



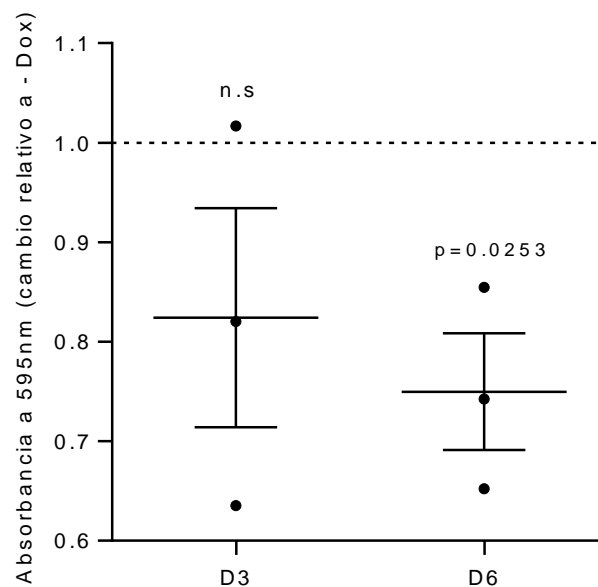
## 4.2 Análisis del efecto biológico de la modulación de MITFA

### 4.2.1 La expresión de MITFA reduce el número de células PC3 en crecimiento

El análisis del crecimiento celular a diferentes tiempos (día 0, día 3 y día 6) se ha realizado mediante la tinción con cristal violeta de las placas.

La figura número 5 muestra cómo las células PC3 TRIPZ-MITFA tratadas con doxiciclina presentan un descenso progresivo en número de células, siendo los valores estadísticamente significativos a día 6 del experimento ( $p = 0.0253$ ). De este modo, se puede concluir que la expresión de MITFA tiene un efecto supresor del crecimiento celular en las células PC3.

Es importante recalcar que el laboratorio ha realizado previamente experimentos complementarios para descartar posibles efectos de la doxiciclina sobre el crecimiento celular en un modo independiente a MITFA.



**Figura 5. La expresión de MITFA induce un descenso en el crecimiento de las células PC3.** La representación esquemática del cambio relativo a nuestro control (-Dox) muestra un descenso progresivo en número de células PC3 que expresan MITFA. Los valores están normalizados al número de células en el día 0. Se muestran resultados estadísticamente significativos a día 6 de la incubación de las placas. El número de réplicas biológicas realizadas ha sido 3. Las barras de error muestran la desviación estándar de la media.

#### 4.2.2 La expresión de MITFA disminuye la capacidad de formación de colonias de las células PC3

El análisis de la capacidad formadora de colonias de las células PC3 en presencia y ausencia de doxiciclina se ha llevado a cabo mediante el análisis del crecimiento independiente de anclaje.

MITFA disminuye la capacidad formadora de colonias de las células PC3 (Figura 6). Sin embargo, la falta de comparabilidad en una de las réplicas biológicas realizadas, en la que no se obtuvieron colonias en presencia de doxiciclina, no ha permitido realizar la gráfica estadística. Por tanto, se necesitan realizar más experimentos para extraer resultados más concluyentes.



**Figura 6.** MITFA muestra un efecto de reducción en la capacidad formadora de colonias de las células PC3. Imagen representativa de una de las réplicas biológicas realizadas. Resultados dos semanas después de la incubación de las placas.

A falta de realizar más experimentos, los resultados del agar blando muestran cómo un contexto de sobreexpresión de MITFA en las células PC3 tiene la capacidad de reducir la agresividad de las células y su consiguiente capacidad formadora de colonias. (Figura 6)

## 5- Discusión

El factor de transcripción MITF ha sido descrito como un potente regulador de señales celulares, y es responsable de la activación de muchos genes involucrados en el ciclo celular, proliferación, crecimiento y supervivencia<sup>6</sup>. MITF es una proteína muy promiscua y las interacciones proteína-proteína en las que participa son clave en la estricta regulación de sus mecanismos transcripcionales. Por tanto, su capacidad de modular múltiples cascadas de señalización y la gran cantidad de genes diana descritos hasta el momento, nos lleva a plantearnos las diferentes funciones que puede llevar a cabo según el tipo celular o tejido<sup>5</sup>.

En el caso del melanoma maligno, una vez desarrollada la enfermedad, la presencia de MITF se asocia exclusivamente a propiedades oncogénicas y se han descrito diferentes mecanismos de sustentación tumoral<sup>7</sup>. La fosforilación de un residuo de tirosina de la isoforma MITFM en melanoma da lugar a la activación de genes dianas asociados a la supresión de la senescencia, fenotipos invasivos y progresión del ciclo celular, entre otros<sup>11</sup>. Del mismo modo, estudios más recientes han asociado la resistencia a los inhibidores de BRAF (oncogén frecuentemente mutado en melanoma) con la activación de MITFM y sus programas transcripcionales<sup>12</sup>. Además, trabajos experimentales han mostrado cómo MITFM regula los niveles de PGC1 $\alpha$ , y este último es a su vez responsable de su efecto biológico<sup>8,9</sup>. Por ello, la terapia actual de algunos tipos de melanoma busca incorporar o combinar inhibidores de la actividad de MITF, con el objetivo de frenar el desarrollo y transformación de melanocitos malignos.

El cáncer de próstata presenta un sistema contrario al descrito en melanoma. En este caso, la activación de MITF y más concretamente la actividad de su isoforma principal, MITFA, se ha asociado a propiedades supresoras de crecimiento y como se ha podido comprobar en los ensayos realizados *in vitro*, tiene la capacidad de frenar el crecimiento de células PC3 y disminuir su capacidad formadora de colonias independientes de anclaje.

Estas diferencias observadas en la actividad de MITF en función del tejido en el que se encuentre, pueden venir provocadas por la implicación de diferentes isoformas en cada uno de los casos. Además, en función del tejido, las interacciones proteína-proteína de este factor de transcripción pueden ser diferentes, de tal manera que ya no sólo hablamos

de la modulación de su propia actividad sino también de la de otras proteínas que pudieran estar involucradas en la enfermedad.

Por consiguiente, es importante estudiar el papel regulador de MITF en combinación con otras vías de señalización o metabólicas para poder integrar la información de un programa transcripcional más complejo. En el caso del cáncer de próstata, la caracterización de MITFA abre las puertas hacia el análisis de su implicación en el efecto biológico de PGC1 $\alpha$ . De este modo, y recíprocamente, siguiendo la bibliografía existente en melanoma, creemos que el efecto biológico de MITF podría estar mediado por el incremento de PGC1 $\alpha$ . Ambas proteínas tienen actividad supresora de la proliferación celular en el cáncer de próstata, pero necesitamos conocer la relación entre ellas y elucidar sus mecanismos de acción biológica.

## **6- Conclusiones y visión de futuro**

El diseño y validación de la línea celular PC3 TRIPZ-MITFA, ha permitido estudiar alguno de los efectos biológicos de MITF en cáncer de próstata. De este modo, se ha podido inferir que el factor de transcripción MITF (isoforma A) tiene un papel importante como supresor de la proliferación de células de CaP. Asimismo, la caracterización establecida permite diseñar nuevos experimentos e incluso repetir alguno de los realizados para aumentar la “n” experimental y extraer resultados más concluyentes.

Con una perspectiva futurista, una vez caracterizado el papel de MITFA en CaP, el siguiente paso sería estudiar su relación en términos biológicos con PGC1 $\alpha$ , co-regulador que ha inspirado esta investigación. Por tanto, el estudio del silenciamiento de PGC1 $\alpha$ , mediante un sistema de shARN (*short hairpin* ARN) y en un contexto de expresión de MITFA nos permitiría desvelar esta relación.

## 7- Bibliografía

1. Torrano, V. *et al.* The metabolic co-regulator PGC1 $\alpha$  suppresses prostate cancer metastasis. *Nat. Cell Biol.* **18**, 645–656 (2016).
2. Wallace, M. & Metallo, C. M. PGC1 $\alpha$  drives a metabolic block on prostate cancer progression. *Nat. Cell Biol.* **18**, 589–590 (2016).
3. Valcarcel-Jimenez, L., Torrano, V. & Carracedo, A. New insights on prostate cancer progression. *Cell Cycle* **16**, 13–14 (2017).
4. Kypta, R., Unda, M. & Carracedo, A. Is the bench getting closer to the bedside in the war on cancer? A quick look at prostate cancer. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **3**, 1–4 (2012).
5. Saravanaperumal, S. A., Pediconi, D., Renieri, C. & La Terza, A. Alternative splicing of the sheep MITF gene: Novel transcripts detectable in skin. *Gene* **552**, 165–175 (2014).
6. Capowski, E. E. *et al.* Loss of MITF expression during human embryonic stem cell differentiation disrupts retinal pigment epithelium development and optic vesicle cell proliferation. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 6332–6344 (2014).
7. Kawakami, A. & Fisher, D. E. The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology. *Lab. Investig.* **6**, 1–8 (2017).
8. Vazquez, F. *et al.* PGC1 $\alpha$  Expression Defines a Subset of Human Melanoma Tumors with Increased Mitochondrial Capacity and Resistance to Oxidative Stress. *Cancer Cell* **23**, 287–301 (2013).
9. Haq, R. *et al.* Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 $\alpha$  and MITF. *Cancer Cell* **23**, 302–315 (2013).
10. Ohnuki, Y., Marnell, M. M., Babcock, M. S., Lechner, J. F. & Kaighn, M. E. Chromosomal Analysis of Human Prostatic Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancer Res.* **40**, 524–534 (1980).
11. Phung, B. *et al.* KITD816V induces SRC-mediated tyrosine phosphorylation of MITF and altered transcription program in melanoma. *Mol. Cancer Res.* (2017).
12. Aida, S. *et al.* MITF suppression by CH5552074 inhibits cell growth in melanoma cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **79**, 1187–1193 (2017).