

## 8. ANEXOS

### Anexo 1. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				X
ODS 2. Hambre cero.				X
ODS 3. Salud y bienestar.	X			
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.				X
ODS 13. Acción por el clima.				X
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

Los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) son un conjunto de objetivos globales adoptados el 25 de septiembre de 2015 con la finalidad de poner fin a la pobreza, proteger el planeta y mejorar las vidas y las perspectivas de las personas en todo el mundo. Resulta, por tanto, de gran importancia hacer cumplir estos objetivos en la práctica profesional y en todos los ámbitos.

Este trabajo se encuentra fuertemente relacionado con el ODS 3. Salud y bienestar. Este ODS tiene como finalidad garantizar una vida sana y promover el bienestar. En concreto, se puede relacionar con el punto 3.4 “reducir en un tercio la mortalidad prematura por enfermedades no transmisibles”, pues el cáncer de próstata es una enfermedad no transmisible que en estados avanzados presenta una esperanza de vida de tan solo 5 años. El desarrollo de nuevas dianas terapéuticas resulta de especial relevancia para evitar este hecho.

## **Anexo 2. Protocolo seguido para la purificación del plásmido**

### Día 1.

1. Haciendo uso de un asa de siembra, se plaquearon en placas 50  $\mu$ L de *E. coli* que contiene el vector lentiviral en una placa de LB agar autoclavado.
2. Incubar las placas en un incubador estático a 37 °C durante toda la noche.

### Día 2.

1. Hacer un minicultivo a partir de una colonia de bacteria de 3 mL de LB más ampicilina. Incubar a 37 °C en un agitador hasta el final del día.
2. Al final del día, transferir 500  $\mu$ L del medio a un matraz Erlenmeyer de 1 L con 250 mL de LB más ampicilina. Incubar durante toda la noche en un agitador a 37 °C.

### Día 3.

1. Recoger el cultivo y centrifugar a 4.500 rpm durante 10 min a RT.
2. Descartar el sobrenadante, resuspender el pellet en 5 mL de Solución I (4.5 g glucosa + 1.5 g Tris + 1.86 g EDTA, hasta un volumen de 500 mL con H<sub>2</sub>O) fría y transferir a un Falcon de 50 mL.
3. Añadir 25 mg de lisozima (2.000 U/mg) e incubar a RT durante 8 min.
4. Añadir 10 mL de Solución II recién hecha (22.75 mL H<sub>2</sub>O MQ + 1.25 mL 20% SDS + 1 mL 5M NaOH), incubar en hielo durante 10 min, con agitación regular con la mano. Asegurarse de que la solución parece “melosa” y no hay hebras o solución lechosa al final de la incubación.
5. Añadir 7.5 mL de Solución III (147.21 g acetato potásico + 57.5 mL ácido acético, hasta un volumen de 500 mL con H<sub>2</sub>O) e incubar en hielo durante 10 min.
6. Centrifugar los tubos a 12.000 rpm a 4 °C durante 20 min.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, añadir 14 mL (0.6 vol) de isopropanol RT e incubar a RT durante 30 min.
8. Centrifugar a 9.000 rpm a 4 °C durante 20 min.
9. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet 10 min.
10. Resuspender en 4 mL de TE (10 mM Tris a pH 8.0 + 1 mM EDTA a pH 8.0), pipeteando o vorteoando, o dejar en un agitador de plataforma basculante durante 10 min.
11. Añadir 2 mL (0.5 vol) 8 M Acetato de amonio (4 °C) e incubar en hielo 30 min.
12. Centrifugar a 10.000 rpm a 4 °C 10 min.
13. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, añadir 12 mL (2 vol) con etanol 100% frío e incubar a -20 °C durante 1 h hasta toda la noche.

### Día 4.

1. Centrifugar a 10.000 rpm a 4 °C durante 10 min.
2. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet durante 10 min.
3. Añadir 500  $\mu$ L de TE para resuspender (sin vortear ni pipetear, mezclar por inversión y dejar en un agitador de plataforma basculante), luego transferir a un microtubo de 1.5 mL.
4. Añadir 1  $\mu$ L de RNasa 10 mg/mL e incubar a 37 °C durante 30 min.
5. Añadir 250  $\mu$ L de fenol (4 °C) + 250  $\mu$ L de cloroformo, vortear 30 segundos y centrifugar a máxima velocidad a RT durante 5 min.

6. Transferir la fase superior acuosa a un nuevo microtubo y añadir 250  $\mu$ L de cloroformo. Vortear 30 segundos y centrifugar a máxima velocidad a RT durante 5 min.
7. Repetir el paso anterior.
8. Transferir la fase superior acuosa a un nuevo microtubo.
9. Preparar un microtubo de 1.5 mL adicional con 1 mL de etanol 70% frío.
10. Añadir 50  $\mu$ L de 3 M acetado de sodio al DN, mezclar bien.
11. Realizar este paso una vez por tubo, añadir 1 mL de etanol 100% frío, mezclar por inversión. El DNA debe precipitar y parecer algodón de azúcar en el tubo, inmediatamente recuperar el DNA usando una punta de 10  $\mu$ L y transferir a un microtubo que contenga etanol al 70%.
12. Centrifugar a máxima velocidad a 4 °C durante 5 min, descartar el sobrenadante y dejar secar durante toda la noche.
13. Resuspender en TE (con un volumen dependiente del tamaño del pellet) y cuantificar el DNA resultante.

# 54113143:TFG\_DANIEL\_ARVELO \_DEL\_ROSARIO.pdf

*por Daniel Arvelo Del Rosario*

---

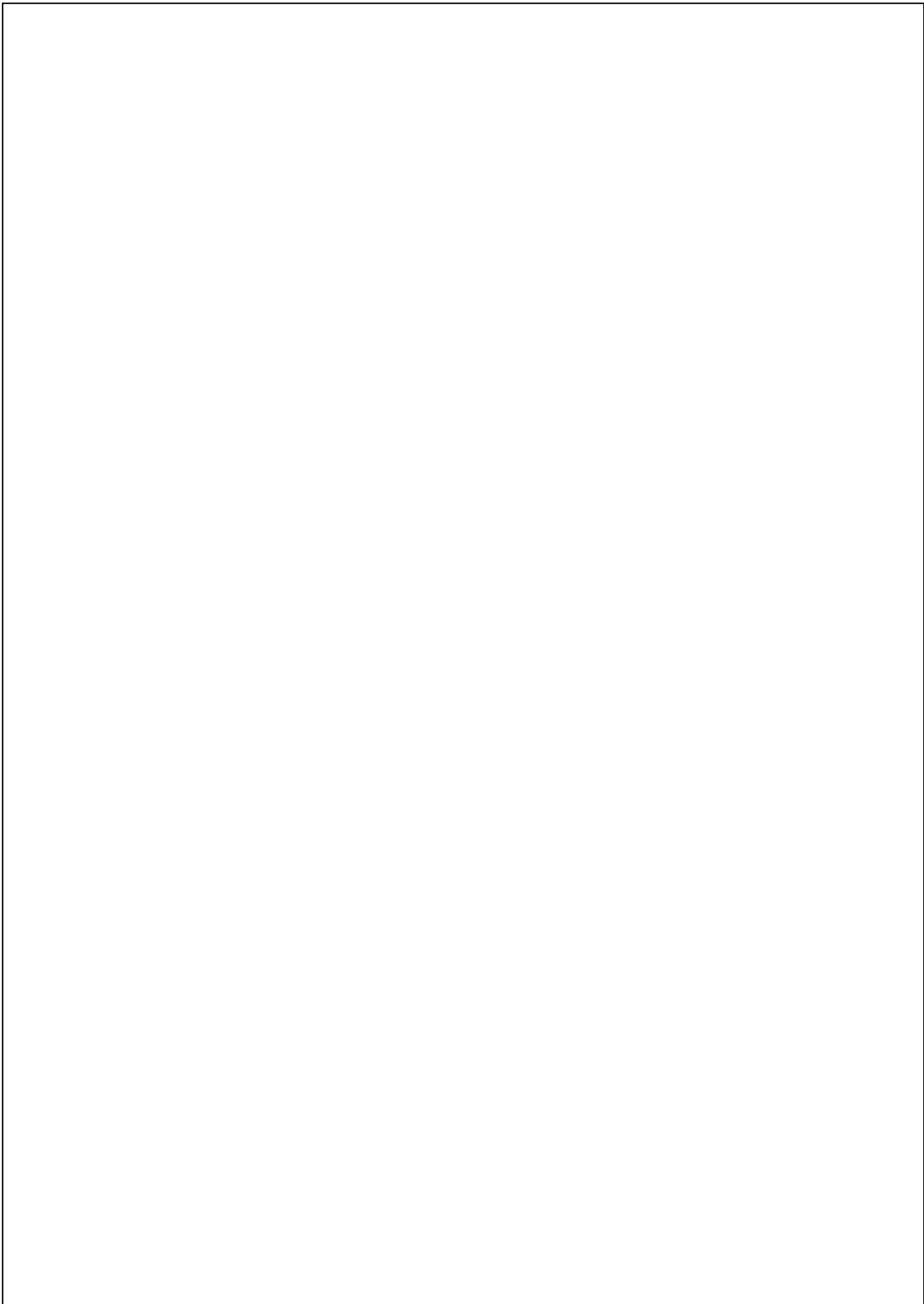
**Fecha de entrega:** 09-jun-2023 01:40p.m. (UTC+0200)

**Identificador de la entrega:** 2112448455

**Nombre del archivo:** 84-07b9-4afc-a2af-51728fb646c1\_TFG\_DANIEL\_ARVELO\_DEL\_ROSARIO.pdf (1.24M)

**Total de palabras:** 15082

**Total de caracteres:** 81466





UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agrònoma  
i del Medi Natural



Instituto de Investigación  
Sanitaria La Fe

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del  
Medio Natural

---

# EVALUACIÓN DE LSM4 COMO POTENCIAL DIANA TERAPÉUTICA EN CÁNCER DE PRÓSTATA

---

Trabajo Fin de Grado  
Grado en Biotecnología

**AUTOR/A:** Arvelo del Rosario, Daniel

**TUTOR/A:** Jantus Lewintre, Eloisa

**COTUTOR/A EXTERNO:** Puchades Carrasco, Leonor

**DIRECTOR/A EXPERIMENTAL:** Gómez Cebrián, Nuria

**CURSO ACADÉMICO:** 2022/2023



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

## Resumen

El cáncer de próstata (CaP) es el segundo cáncer más común a nivel mundial y el primero más diagnosticado en España para el año 2023 en hombres. Si bien el CaP presenta una dependencia a los andrógenos para proliferar, los pacientes en estadios avanzados pueden desarrollar resistencia a las terapias de deprivación androgénica (TDA), y progresar hacia un fenotipo conocido como CaP resistente a la castración. A pesar de que existen diferentes tratamientos para estos pacientes, el CaP continúa siendo incurable cuando progresa a etapas más avanzadas. Ante esta situación, sigue siendo necesaria la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas que puedan contribuir a aumentar la supervivencia y mejorar la calidad de vida en pacientes con CaP. Una aproximación prometedora para la identificación de nuevas dianas terapéuticas es la identificación de vulnerabilidades genéticas, requeridas para la proliferación celular, a partir de datos de cribados de silenciamiento génico. Además, la combinación del análisis de genes esenciales con análisis de expresión diferencial y de progresión de la enfermedad puede ayudar a identificar genes directamente asociados con la progresión del tumor. En este contexto, un análisis previo llevado a cabo en el laboratorio permitió identificar 16 potenciales dianas terapéuticas para este tumor, entre las cuales se encuentra LSM4 (U6 small nuclear RNA and mRNA degradation associated). Varios estudios han observado la relación de este gen con la proliferación tumoral en numerosos tipos de cánceres, aunque existen pocos estudios realizados en CaP.

El objetivo de este trabajo fue evaluar LSM4 como potencial diana terapéutica para el CaP. En primer lugar, se examinó la *druggability* de LSM4 recopilando información relacionada con el tamaño, su localización subcelular, características químicas y estructurales de diferentes bases de datos. A continuación, se evaluaron sus niveles relativos tanto de RNA mensajero (mRNA) como de proteína, mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) y *Western blot*, respectivamente, en distintos modelos celulares de próstata. Finalmente, se generó un modelo *knockdown* de LSM4 en la línea celular de próstata PC3 a través de la infección con partículas lentivirales.

Los resultados obtenidos mostraron la relevancia de LSM4 en cáncer, observando una asociación del gen con procesos como el *splicing* del pre-mRNA o el ensamblaje de los cuerpos de procesamiento (*P-bodies* o PB). Así mismo, esta potencial diana presentaba ciertas características químicas y estructurales que sugieren que pueda ser modulable por la unión de fármacos. A continuación, el análisis de sus niveles relativos reveló que los modelos celulares de CaP presentaban unos niveles mayores de LSM4 en comparación con el modelo celular sano. Finalmente, se utilizaron diferentes vectores de shRNA para diseñar diferentes modelos *knockdown* de LSM4, observando que los vectores sh-8 y sh-11 mostraban una mayor eficiencia en el silenciamiento. Así, estos resultados podrían indicar la relevancia de LSM4 en el desarrollo tumoral, lo que convierte a LSM4 en potencial diana terapéutica para el tratamiento del CaP.

Este trabajo se relaciona con el siguiente ODS de la Agenda 2030: ODS número 3, que tiene por título "Salud y bienestar".

**Palabras clave:** Cáncer de próstata (CaP), U6 small nuclear RNA and mRNA degradation associated (LSM4), diana terapéutica, genes esenciales

**Autor:** Daniel Arvelo del Rosario

**Tutora académica:** Eloísa Jantus Lewintre

**Tutora externa:** Leonor Puchades Carrasco

**Directora experimental:** Nuria Gómez Cebrián

**Localización y fecha:** Valencia, junio de 2023



# Evaluation of LSM4 as potential therapeutic target in prostate cancer

## *Abstract*

Prostate cancer (PCa) is the second most common cancer worldwide and the first most diagnosed in Spain by the year 2023 in men. Although PCa is dependent on androgens to proliferate, patients in advanced stages can develop resistance to androgen deprivation therapies (ADT), and progress towards a phenotype known as castration resistant PCa. Although there are different treatments for these patients, PCa continues to be incurable when it progresses to more advanced stages. Given this situation, it is still necessary to search for new therapeutic targets that can contribute to increase survival and improve the life quality of PCa patients. A promising approach for the identification of new therapeutic targets is the identification of genetic vulnerabilities, required for cell proliferation, using gene silencing screening data. In addition, the combination of essential genes analysis with differential expression analysis and disease progression can help to identify genes directly associated with tumor progression. In this context, a previous analysis carried out in the laboratory allowed us to identify 16 potential therapeutic targets for this tumor, including LSM4 (U6 small nuclear RNA and mRNA degradation associated). Several studies have observed the relation between this gene and tumor proliferation in numerous cancers, although, there are few studies conducted in PCa.

The objective of this work was to evaluate LSM4 as a potential therapeutic target in PCa. First, LSM4 druggability was analyzed based on information related to its size, its subcellular location, its chemical and structural characteristics collected from different databases. Then, its messenger RNA (mRNA) and protein relative levels were evaluated, using real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and Western blot, respectively, in different prostate cell models. Finally, using lentiviral particles infection, a LSM4 knockdown model was made in PC3 prostate cell line.

The results obtained showed the relevance of LSM4 in cancer, showing relationships with processes such as pre-mRNA splicing or the processing bodies (P-bodies or PB) assembly. In addition, it presented specific chemical and structural characteristics that suggest that it can be modulated by the union of drugs. Then, its relative levels analysis revealed that PCa cell models had higher levels of LSM4 compared to the healthy cell model. Finally, it was used different shRNA vectors to design different LSM4 knockdown models, showing that sh-8 and sh-11 vectors had a better silence efficiency. Thus, these results indicate the relevance that LSM4 may have in tumor development, which makes LSM4 a potential therapeutic target for the treatment of PCa.

This project can be related with the following 2030 Agenda SDG: SDG number 3, which has as title "Good health and well-being".

**Keywords:** Prostate cancer (PCa), U6 small nuclear RNA and mRNA degradation associated (LSM4), therapeutic target, essential genes

**Author:** Daniel Arvelo del Rosario

**Academic tutor:** Eloísa Jantus Lewintre

**External tutor:** Leonor Puchades Carrasco

**Experimental director:** Nuria Gómez Cebrián

**Location and date:** Valencia, June 2023

## Agradecimientos

En primer lugar, a mis tutoras de TFG, la Dra. Leonor Puchades Carrasco y la Dra. Eloisa Jantus Lewintre, que me han permitido realizar este trabajo. Quiero agradecer a Leonor, por enseñarme el trabajo real de un laboratorio, por hacerme valorar el trabajo y la dedicación que transmite en todo lo que se realiza en el laboratorio, así como por la confianza que ha depositado en mí en cada paso que daba. A Eloísa, por estar siempre atenta a las numerosas dudas que me iban surgiendo a lo largo de los meses y seguir siempre mis avances.

Gracias a todo el laboratorio de Descubrimiento de Fármacos, así como el resto de compañeros de IIS La Fe con la que he tenido la suerte de coincidir, que me han hecho aprender y en muchas ocasiones hacer que los días fueran más amenos. En especial agradecer a mis compañeros de bancada: María y Manu, compañeros con los que he compartido las frustraciones del TFG, pero también las alegrías de los resultados obtenidos. También agradecer a los demás compañeros que han pasado por el laboratorio, Lien, Dani y Kato y sin los cuales no habría podido conseguir muchas cosas.

Quiero agradecer también a Inés, mi pilar fundamental en el laboratorio, apoyándonos en los peores momentos, a la vez que compartíamos confesiones y risas. Tengo claro que te va a ir genial en todo lo que te propongas, eres una luchadora.

Agradecer también a la Dra. Nuria, mi directora experimental, de la cual me llevo el mayor de los aprendizajes. Te has convertido en mi referente y has despertado en mí la pasión por la investigación. Siempre recordaré tus consejos y el esfuerzo que ponías en ayudar y comprender a cada uno de tus estudiantes.

Gracias también a todos mis amigos, tanto a los que han estado conmigo muchos años atrás en Tenerife, como a las grandes amistades que he hecho durante estos años viviendo en Valencia, llegué solo y me acogieron y han convertido esta ciudad en mi segunda casa. En especial agradecer a Cristina, Raquel, Paloma y las 3 Marías: Gómez, Marín y Colomer. 4 años hemos pasado aguantándonos, 4 años de muchas risas y alguna que otra lágrima. Tan solo me quedo con la seguridad de que vamos a seguir unidos a pesar de terminar esta etapa y que encontraremos nuestro lugar allá donde vayamos.

Por último, y quizás los más importantes, agradecer a mi familia, mi madre, mi padre y mi hermana. Las personas que de verdad han estado conmigo desde el primer momento, quienes han apoyado todas las decisiones que tomaba a pesar de equivocarme numerosas veces y que, a pesar de estar a kilómetros de distancia, siempre han conseguido consolarme. Mamá y Papá, el esfuerzo y sacrificio que han puesto en mí es que el que ha permitido que pueda estar cumpliendo mis sueños. Jamás podré agradecerse los lo suficiente.



## Índice

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. CÁNCER DE PRÓSTATA .....	1
1.2. TRATAMIENTOS ACTUALES .....	3
1.3. CARACTERIZACIÓN DE POTENCIALES DIANAS TERAPÉUTICAS .....	5
2. OBJETIVOS .....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	11
3.1. BASES DE DATOS .....	11
3.1.1. Bases de datos para el estudio de <i>druggability</i> de la diana.....	11
3.1.2. Bases de datos para la selección de parejas de <i>primers</i> .....	11
3.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN MODELOS CELULARES ..	12
3.2.1. Líneas celulares de cáncer de próstata .....	12
3.2.2. Cultivos celulares y reactivos .....	12
3.2.3. PCR cuantitativa en tiempo real .....	12
3.2.4. <i>Western blot</i> .....	14
3.3. GENERACIÓN DE LSM4 <i>KNOCKDOWN</i> .....	15
3.3.1. Plásmidos shRNA.....	15
3.3.2. Preparación de plásmidos.....	15
3.3.3. Generación lentiviral.....	16
3.3.4. Infección celular .....	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	19
4.1. POTENCIAL <i>DRUGGABILITY</i> DE LSM4 .....	19
4.2. EVALUACIÓN DE LSM4 COMO DIANA TERAPÉUTICA EN CÁNCER DE PRÓSTATA.....	20
4.2.1. Papel de LSM4 en el <i>splicing</i> .....	20
4.2.2. Papel de LSM4 en los <i>P-bodies</i> .....	22
4.2.3. Efecto de LSM4 en cáncer .....	24
4.2.4. <i>LSM4</i> está sobre-expresado en cáncer de próstata y está correlacionado con el pronóstico del paciente .....	24
4.3. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES RELATIVOS DE LSM4 EN MODELOS CELULARES DE PRÓSTATA .....	26
4.4. GENERACIÓN DE UN MODELO DE SILENCIAMIENTO DE <i>LSM4</i> EN PC3.....	30
5. LÍNEAS FUTURAS.....	33
6. CONCLUSIÓN .....	35
7. BIBLIOGRAFÍA .....	37
8. ANEXOS .....	45

## Índice de figuras

Figura 1. Tasas de la incidencia global de cáncer (excluidos los cutáneos no melanoma) y de los cánceres más frecuentes en hombres en España entre los años 2002 y 2023 .....	1
Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de selección de potenciales dianas terapéuticas .....	7
Figura 3. Estrategia de producción de lentivirus .....	16
Figura 4. Localización subcelular de LSM4 .....	19
Figura 5. Estructura 3D del PDB ID: 3JCR .....	20
Figura 6. Papel de LSM4 en el proceso de splicing .....	21
Figura 7. Papel de LSM4 en la formación de los P-bodies .....	23
Figura 8. <i>LSM4</i> está sobre-expresado en CaP .....	25
Figura 9. <i>LSM4</i> está asociado con la progresión del CaP .....	25
Figura 10. Niveles de expresión relativa de <i>LSM4</i> a nivel de mRNA utilizando <i>B2M</i> como <i>housekeeping gene</i> .....	26
Figura 11. Resultados del Primer-BLAST para los primers seleccionados .....	27
Figura 12. Representación gráfica de los umbrales de ciclo de los <i>housekeeping genes</i> en las RT-qPCRs.....	28
Figura 13. Expresión relativa de <i>LSM4</i> a nivel de mRNA utilizando <i>GAPDH</i> como <i>housekeeping gene</i> ..	29
Figura 14. Niveles relativos de <i>LSM4</i> a nivel de proteína utilizando <i>GAPDH</i> como control de carga ..	29
Figura 15. Silenciamiento de la expresión a nivel de mRNA de <i>LSM4</i> en la línea celular PC3 usando shRNA mediado por lentivirus .....	31
Figura 16. Niveles relativos de proteína LSM4 en la línea celular PC3 después del silenciamiento del gen <i>LSM4</i> usando shRNA mediado por lentivirus.....	31

## Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación y líneas de tratamiento en pacientes con cáncer de próstata localizado.....	3
Tabla 2. Parámetros de referencia para la elección de primers.....	11
Tabla 3. Descripción de la <i>Master mix</i> utilizada para la transcripción reversa del RNA purificado .....	13
Tabla 4. Descripción de la <i>Master mix</i> de reacción usado para la RT-PCR .....	13
Tabla 5. Secuencias de los primers utilizados en la RT-qPCR.....	13
Tabla 6. Anticuerpos utilizados en el <i>Western blot</i> .....	14
Tabla 7. Construcciones shRNA usadas para el gen <i>LSM4</i> .....	15



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. CÁNCER DE PRÓSTATA

El cáncer de próstata (CaP) es un tumor sólido hormono dependiente (Sathianathen *et al.*, 2018). Está caracterizado por una gran heterogeneidad clínica, que se traduce en una respuesta clínica muy variable: desde fenotipos indolentes hasta un fenotipo metastásico agresivo en ganglios linfáticos y hueso (Sathianathen *et al.*, 2018). El CaP presenta una incidencia de 1.2 millones de nuevos casos diagnosticados mundialmente, convirtiéndose en el segundo cáncer más común en hombres, excediendo las 350.000 muertes anuales en todo el mundo. Se trata de un cáncer fuertemente asociado a la edad, siendo el 85% de los pacientes diagnosticados mayores de 60 años (Rebello *et al.*, 2021). De acuerdo con la Sociedad Española de Oncología Médica (*El cáncer en cifras | SEOM: SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ONCOLOGÍA MÉDICA*, 2023), la estimación de nuevos casos diagnosticados para el año 2023 en España es de 29.002, convirtiéndose, tal y como se muestra en la figura 1, en el primer cáncer en número de nuevos casos diagnosticados en hombres.

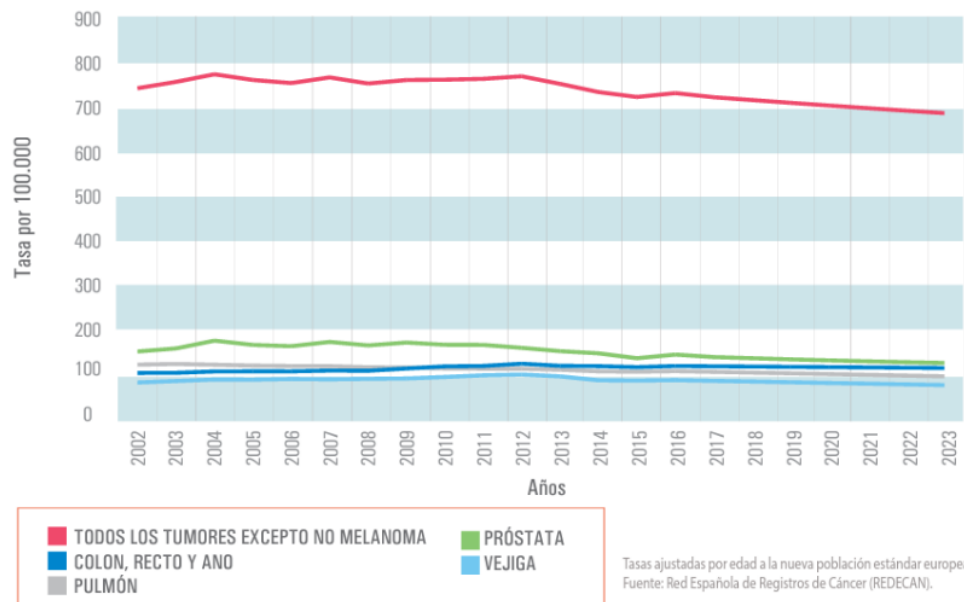


Figura 1. Tasas de la incidencia global de cáncer (excluidos los cutáneos no melanoma) y de los cánceres más frecuentes en hombres en España entre los años 2002 y 2023. Obtenida de la SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ONCOLOGÍA MÉDICA: *Las cifras del cáncer en España 2023*.



## Introducción

El diagnóstico precoz resulta esencial para el buen pronóstico de la enfermedad, pues cuando se diagnostica en un estadio temprano, el CaP localizado presenta una supervivencia del 99% (Siegel *et al.*, 2018). Actualmente, se utiliza la examinación rectal digital (DRE por sus siglas en inglés) y la prueba de antígeno específico de próstata (PSA) como métodos convencionales para el cribado del CaP (Sekhoacha *et al.*, 2022). La DRE consiste en una detección rectal de anomalías en la próstata en busca de rigidez y áreas duras conocidas como nódulos (Bilal *et al.*, 2022; Rebello *et al.*, 2021). La prueba del PSA se basa en la medición de la serina proteasa, relacionada con la calicreína, que es producida por las células epiteliales de la próstata de forma normal, aunque a mayores niveles en el cáncer de próstata, considerándose un valor de 4 ng/mL como límite superior normal (Saini, 2016). Sin embargo, estudios recientes han mostrado que alrededor del 20% de los hombres con un nivel de PSA menor de 4 ng/mL presentaban CaP y que hombres con niveles elevados de PSA no presentaban la enfermedad (Cary & Cooperberg, 2013). Además, los niveles de PSA pueden aumentar en casos de prostatitis, hiperplasia prostática benigna y en cirugías y biopsias de la próstata, debido a que se pueden producir roturas de la membrana basal epitelial de la próstata (Cary & Cooperberg, 2013).

Si los resultados de estas pruebas indican presencia de CaP, se suele recurrir a realizar una biopsia de próstata guiada por ecografía de las áreas sospechosas para la confirmación histológica (Szeliski *et al.*, 2018). A pesar de esto, la no especificidad de estas tres pruebas diagnósticas, la incapacidad de distinguir el estadio del tumor y la invasión de las pruebas hacia el paciente, suponen problemas de sobre-diagnóstico y sobre-tratamiento en casos de CaP de bajo riesgo (Cary & Cooperberg, 2013; Hendriks *et al.*, 2016).

Una vez diagnosticados, los pacientes de CaP se pueden estratificar según la agresividad del tumor. El sistema de clasificación más utilizado es el descrito por el Dr. Donald F. Gleason, que se basa en el estudio de patrones histológicos de la estructura glandular (Wadosky & Koochekpour, 2016). El grado de Gleason (GS por sus siglas en inglés) tiene en cuenta el valor del patrón predominante en la biopsia histológica en comparación con una serie de patrones estructurales que van desde el grado 1, con una estructura glandular sana, hasta un grado 5 con glándulas discretas casi inexistentes con láminas y cordones de células. A este primer valor se le añade el segundo patrón de la biopsia más común, consiguiendo valores de Gleason que van de 2 a 10. Sin embargo, el GS presenta ciertas limitaciones, ya que los valores pueden no describir la situación del tumor, sobre todo en tumores con un valor de GS de 7, pues este puede ser debido a un caso de peor pronóstico (4 + 3) o de mejor pronóstico (3 + 4) (Epstein *et al.*, 2016; Mottet *et al.*, 2017; Swanson *et al.*, 2021). Estos problemas de

clasificación que muestra el método de clasificación de Gleason han llevado a la Asociación Europea de Urología (EAU por sus siglas en inglés) a introducir un nuevo sistema de clasificación (Wadosky & Koochekpour, 2016), siendo los pacientes categorizados en riesgo bajo, riesgo intermedio y riesgo alto. Para realizar esta valoración, aunque se tiene en cuenta la GS, el factor fundamental es el valor de recurrencia bioquímica (RB), el cual depende de los niveles de PSA medidos después de que un paciente sea sometido a un tratamiento de prostatectomía radical (Jiang *et al.*, 2022). De esta manera, los pacientes de riesgo bajo, intermedio y alto, presentan un ratio de RB > 25%, entre 25% y 50%, y > 50%, respectivamente (Mottet *et al.*, 2017; Rebello *et al.*, 2021).

## 1.2. TRATAMIENTOS ACTUALES

En cuanto al tratamiento, hay que tener en cuenta que no existe un tratamiento único para la enfermedad, sino que depende, principalmente, del estadio tumoral y del pronóstico de cada paciente (Wang *et al.*, 2018). Como se muestra en la tabla 1, para pacientes con la enfermedad localizada, existen diferentes estrategias terapéuticas en función del riesgo.

**Tabla 1. Clasificación y líneas de tratamiento en pacientes con cáncer de próstata localizado.**

Estadio	Características	Tratamiento
Riesgo bajo	PSA < 10 ng/mL	Vigilancia activa (monitoreo de los niveles de PSA, biopsia y resonancia magnética)
Riesgo intermedio	PSA entre 10 ng/mL y 20 ng/mL GS de 7	Prostatectomía radical Radioterapia
Riesgo alto	PSA > 20 ng/mL GS entre 8 y 10	Prostatectomía radical Radioterapia TDA

PSA: antígeno específico de próstata. GS: grado de Gleason. TDA: terapia de privación de andrógenos.

Para muchos de los pacientes con un riesgo bajo, el CaP resulta inofensivo y se encuentra localizado en la próstata, por lo que se recurre a un monitoreo de los niveles de PSA sérico, que no aumenta de los 10 ng/mL, biopsias de la próstata y resonancia magnética. Este posicionamiento surge de la idea de que la calidad de vida puede ser disminuida por un tratamiento más invasivo (Attard *et al.*, 2016; Wadosky & Koochekpour, 2016). Este monitoreo resulta esencial, pues cambios en estos parámetros, que pueden indicar un progreso de la enfermedad, deben suponer también un cambio en el método de tratamiento (Attard *et al.*, 2016).

## Introducción

Por otra parte, para los pacientes con un CaP localizado de riesgo intermedio, definido como aquel que presenta un GS de 7 o niveles de PSA de entre 10 y 20 ng/mL; se puede recurrir a la intervención activa. Una opción es la prostatectomía radical con o sin disección de ganglios linfáticos pélvicos. Otra opción es la radioterapia de haz externo (EBRT por sus siglas en inglés) ya sea de intensidad modulada o arco volumétrico y/o braquiterapia intersticial, ya sea como implantación permanente de semillas radiactivas de baja tasa de dosis o un impulso intervencionista a la EBRT con la introducción a corto plazo de una fuente radiactiva de alta tasa de dosis en el área prostática de interés (Rebello *et al.*, 2021).

Por último, para considerar un paciente como el CaP localizado de alto riesgo, es necesario un GS de entre 8 y 10 y unos niveles de PSA mayores de 20 ng/mL. En estos casos, la alternativa de tratamiento puede ser similar al caso de un riesgo intermedio, aunque se incluye con mucha mayor frecuencia una terapia de privación de andrógenos (TDA). Esta terapia consiste en fármacos inhibitorios de la producción de andrógenos o antagonistas de los receptores de andrógenos (AR), pudiendo llegar a ser implantados de manera combinada, conocido como bloqueo combinado de andrógenos (Wadosky & Koochekpour, 2016). El AR juega un papel fundamental en el CaP localizado pues es el responsable de mediar las acciones de los andrógenos testosterona y dihidrotestosterona en la célula favoreciendo la transcripción de genes relacionados con el desarrollo tumoral, por lo que los tratamientos de TDA suponen una buena aproximación terapéutica en el CaP (Dehm & Tindall, 2011).

A pesar de lo comentado, en el caso del CaP avanzado, el cáncer se vuelve resistente a los tratamientos de TDA y prostatectomía, observado por progresión radiográfica y por un incremento de los niveles de PSA, a pesar de mantenerse los niveles de testosterona existentes tras estos tratamientos (Rebello *et al.*, 2021). Uno de los posibles motivos de aparición de resistencia se debe a la producción de variables de *splicing* del AR, permitiendo continuar con la señalización del receptor incluso a bajas concentraciones de andrógenos (Konda & Viswanathan, 2022). En estos casos, aunque se mantiene la TDA para evitar la función del AR, el tratamiento convencional es la administración de docetaxel como alcaloide antimicrotubular, así como la quimioterapia basada en taxanos y cloruro de radio-233. Existe también un tratamiento terapéutico de vacunación (sipuleucel-T), el cual consiste en una vacuna autóloga de células dendríticas que inmuniza contra el epítipo prostático distintivo fosfatasa ácida (PAP). A pesar de que presenta buenos resultados en pacientes que han sido tratados con TDA, se desconoce su eficacia en pacientes sin TDA. Se trabaja también en terapias dirigidas, como

en los casos de presentar mutaciones en genes de reparación del DNA como el gen del cáncer de mama tipo 1 o tipo 2 (*BRCA1* o *BRCA2*), donde se recurre a inhibidores de la poli ADP ribosa polimerasa (PARP) como olaparib, rucaparib o niraparib (Rebello *et al.*, 2021).

A pesar de que todas estas estrategias terapéuticas han permitido aumentar la esperanza de vida de los pacientes, el CaP sigue siendo incurable en estadios avanzados, presentando una esperanza de vida de 5 años. Es por este motivo por el que es necesaria la búsqueda de nuevas aproximaciones terapéuticas que resuelvan estas limitaciones (Hofbauer *et al.*, 2021; Rebello *et al.*, 2021; Sohlberg *et al.* 2020).

### **1.3. CARACTERIZACIÓN DE POTENCIALES DIANAS TERAPÉUTICAS**

En la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas, una aproximación prometedora es el análisis de cribados génicos (Cheung *et al.*, 2011; Cowley *et al.*, 2014). Estos análisis se basan en la identificación de genes esenciales, definidos como aquellos genes necesarios para la supervivencia de la célula y cuyo silenciamiento suponen una pérdida de la viabilidad celular (Hart *et al.*, 2014). Los análisis de cribados génicos identifican genes esenciales a través de realizar estudios de pérdida de función en líneas celulares que representen la heterogeneidad tumoral (Hart *et al.*, 2014; Tsherniak *et al.*, 2017). Para llevar a cabo la inhibición del gen diana, se puede recurrir a dos tipos de tecnologías diferentes. Por un lado, mediante el uso de RNA de interferencia (RNAi), que son frecuentemente desencadenados a partir de *small hairpin RNA* (shRNA), y que se basan en la degradación del RNA mensajero (mRNA) diana a través de vías endógenas por la complementariedad de secuencia de ambos RNAs. Por otro lado, a través de Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Espaciadas (CRISPR por sus siglas en inglés), que se basan en la acción de una enzima endonucleasa, normalmente cas9, dirigida por un ARN guía que reconoce una región del DNA diana (Shalem *et al.*, 2015). Existen numerosas bases de datos como DepMap (<https://depmap.org/portal/>) o Project Score (<https://score.depmap.sanger.ac.uk/>) que recogen los datos obtenidos de cribados de esencialidad realizados en líneas celulares reflejando distintos tipos de cáncer.

Además de la esencialidad génica, otro aspecto que resulta de gran interés es el análisis de datos de expresión génica. Este análisis puede facilitar la selección de genes relevantes para el desarrollo o la progresión de la enfermedad. En este sentido, estudiar los diferentes patrones de expresión entre sanos y enfermos, así como su papel en la progresión tumoral, puede contribuir a priorizar la

## Introducción

evaluación de genes relacionados con la enfermedad. Además, inhibiciones en genes ampliamente expresados tanto en células cancerosas como en células sanas, puede conducir a la pérdida de viabilidad de estas células sanas (Gashaw *et al.*, 2012; Thserniak *et al.*, 2017), por lo que resulta esencial conocer su expresión en pacientes enfermos y en diferentes estadios de la enfermedad.

La identificación de estas vulnerabilidades génicas en cáncer puede conducir a la caracterización de potenciales dianas terapéuticas, definidas como aquellas proteínas que pueden ser objeto de la acción de un fármaco y que se encuentran directamente asociadas al mecanismo de una enfermedad. Por tanto, un fármaco específico para dicha diana, tendría una acción directa en el beneficio del paciente (Paananen & Fortino, 2020).

Además de examinar la esencialidad y la expresión génica, otro aspecto a tener en cuenta para la selección de potenciales dianas terapéuticas es evaluar su *druggability*, es decir, la capacidad que tendría la proteína diana de unirse a un fármaco (Behan *et al.*, 2019; Duarte *et al.*, 2019). Durante este estudio se pueden tener en cuenta distintos factores como la ubicación y naturaleza de sitios de unión de la proteína, las funciones de la proteína diana y su papel en diferentes rutas metabólicas, los mecanismos de regulación endógena, la localización espacial y temporal, la *druggability* de proteínas homólogas, las propiedades de los moduladores conocidos, y el estado de progreso de estos moduladores conocidos. En esta evaluación, resulta de gran utilidad poseer la estructura cristalizada de la proteína, ya sea sola o cocrystalizada con otras proteínas, ya que permite conocer zonas de unión y ligandos conocidos específicos que puedan modular la actividad de dicha proteína (Brown *et al.*, 2018).

Todo lo comentado, permite plantear un flujo de trabajo para la priorización de la selección de posibles dianas terapéuticas, tal y como se muestra en la figura 2. En primer lugar, se realizaría un estudio de la esencialidad génica, seguido de un estudio de la relevancia de la diana en la enfermedad a partir de datos transcriptómicos de expresión y **relación con la progresión de la enfermedad**. Por último, se recopilaría información relacionada con el tamaño, su localización subcelular, características químicas y estructurales en diferentes bases de datos que permitan discernir la capacidad de *druggability* de la diana.

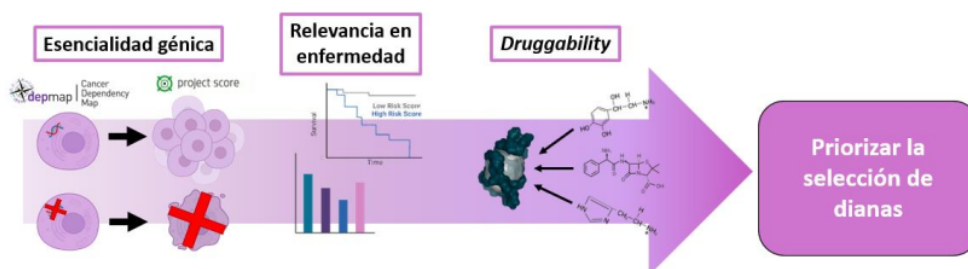
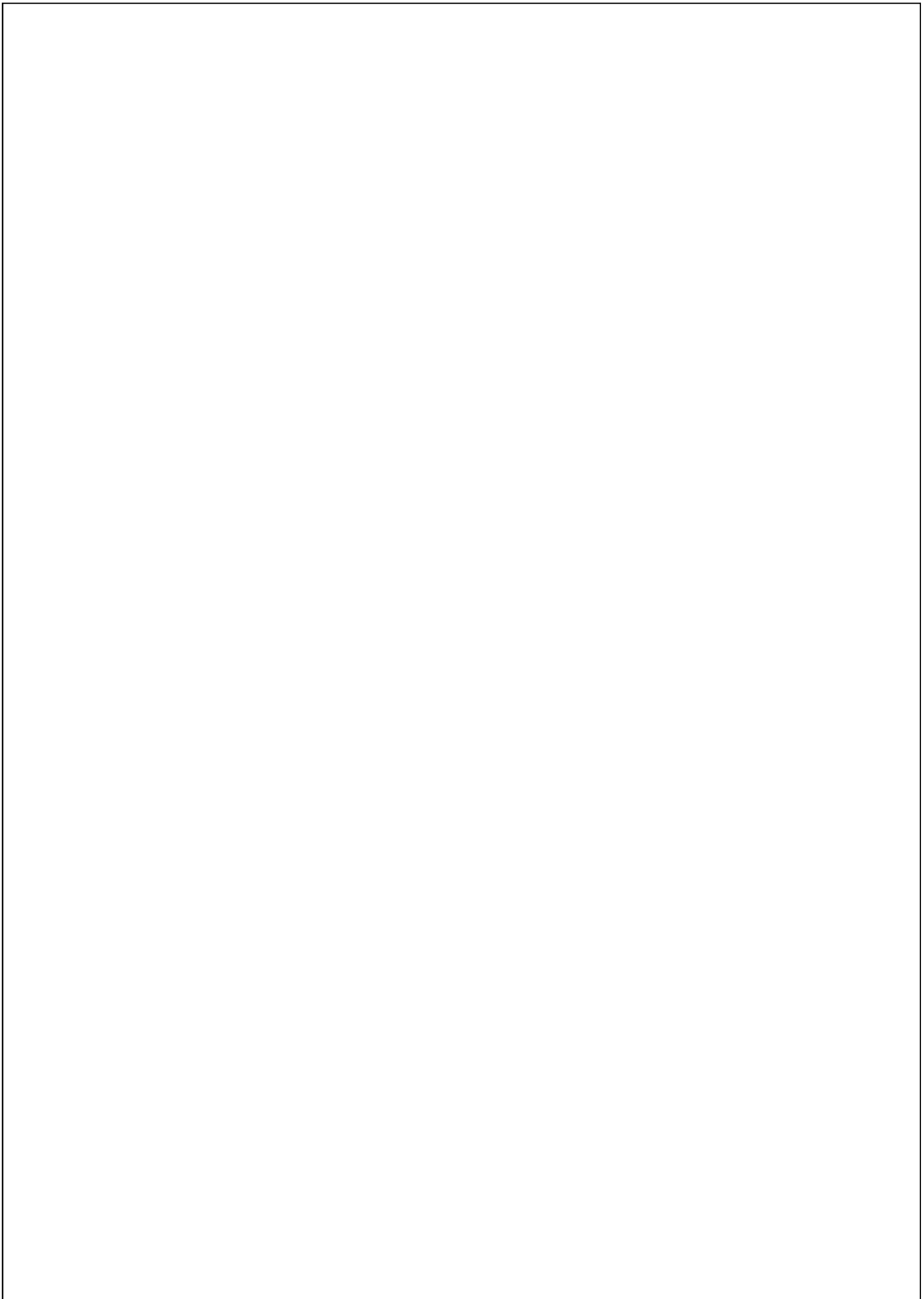


Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de selección de potenciales dianas terapéuticas.

Finalmente, resulta de gran interés añadir, a todos estos resultados, un perfil de eficacia-seguridad equilibrado para garantizar unos efectos secundarios mínimos (Duarte *et al.*, 2019; Paananen & Fortino, 2020).

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



## 2. OBJETIVOS

Considerando todo lo comentado, este trabajo presenta el siguiente objetivo y los siguientes subobjetivos:

1. Validación de LSM4 como potencial diana terapéutica para el tratamiento del CaP.
  - a. Evaluación del potencial papel de LSM4 en el desarrollo del CaP.
  - b. Evaluación de la *druggability* de LSM4.
  - c. Análisis de los niveles relativos de LSM4 en los diferentes modelos celulares de CaP.
  - d. Generación de un modelo *knockdown* de LSM4 en la línea celular de próstata PC3.





### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. BASES DE DATOS

##### 3.1.1. Bases de datos para el estudio de *druggability* de la diana

Se estudió el potencial de *druggability* de LSM4 a través de la información disponible en las bases de datos Uniprot (UniProt Consortium, 2023), Protein Data Bank (PDB) (Berman *et al.*, 2000) y canSAR (Coker *et al.*, 2019). Se analizó el tamaño, la localización subcelular, las características químicas y la existencia de estructura tridimensional para evaluar la capacidad de la proteína de ser modulada por la acción de un fármaco.

##### 3.1.2. Bases de datos para la selección de parejas de *primers*

La selección de los *primers* evaluados se realizó a través de la herramienta online Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012). Para seleccionar el *primer* más adecuado para la amplificación de cada gen, se analizaron los criterios que se recogen en la tabla 2, como son la longitud del producto obtenido, la temperatura de *melting* (Tm) y el porcentaje de guaninas y citocinas (GC%). Además, se tuvo en cuenta el número de *hits* para seleccionar aquellas parejas de *primers* que eran más específicas para el gen que se quería amplificar.

**Tabla 2. Parámetros de referencia para la elección de *primers*.**

Tamaño del producto de PCR mínimo	60
Tamaño del producto de PCR máximo	1000
Tamaño del Primer mínimo	15
Tamaño del Primer óptimo	20
Tamaño del Primer máximo	25
Tm máxima	57
Tm óptima	60
Tm mínima	63
GC% mínimo	20
GC% máximo	80

Tm: Temperatura de *melting*. GC%: porcentaje de guaninas y citocinas

### **3.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN MODELOS CELULARES**

#### **3.2.1. Líneas celulares de cáncer de próstata**

Se utilizaron 5 líneas celulares, con características biológicas y moleculares diferentes: RWPE-1, 22Rv1, LNCaP, DU145 y PC3. RWPE-1 es utilizada como modelo de condición sana, se trata de una línea celular epitelial, derivada de la zona periférica que expresa PSA y AR. 22Rv1 es una línea celular que representa un estadio primario del CaP hormono dependiente, proveniente de un xenoinjerto humano que expresa PSA y AR. LNCaP es un modelo de línea metastásica proveniente de ganglio linfático, con bajo potencial metastásico y hormono dependiente. DU145 representa un modelo de potencial metastásico moderado, fue establecida a partir de una muestra de metástasis cerebral, expresa AR, pero es considerada castración resistente. PC3 sirve como modelo castración resistente, proveniente de metástasis en hueso de un adenocarcinoma de grado IV, presentando un elevado potencial metastásico.

#### **3.2.2. Cultivos celulares y reactivos**

Las células PC3 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (GIBCO), <sup>1</sup> suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS por sus siglas en inglés) y 100 U/mL penicilina/estreptomicina. Las células embrionarias de riñón humano (HEK por sus siglas en inglés) 293T fueron cultivadas en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM por sus siglas en inglés), suplementado con 10% de FBS y 100 U/mL penicilina/estreptomicina. Todas las células crecieron a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub> y el medio de cultivo se reemplazó cada 2 días.

#### **3.2.3. PCR cuantitativa en tiempo real**

Se sembraron 200.000 células en una placa de 6 pocillos y se incubó en 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 48 h. Después de eliminar el medio y lavarlas con PBS frío 1 X, se aisló el RNA usando el RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) y se cuantificó utilizando el nanodrop. El DNA complementario (cDNA) fue sintetizado a partir de 500 ng de RNA usando el QuantiTect Reverse Transcription kit (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. El RNA fue incubado a 42 °C durante 2 min con el *gDNA Wipeout Buffer* el cual contiene DNasa para eliminar el DNA genómico. Las muestras se incubaron a 42 °C durante 15 min después de añadir la *Master mix* preparada según las indicaciones de la tabla 3. Las muestras fueron cargadas por triplicados.

**Tabla 3. Descripción de la *Master mix* utilizada para la transcripción reversa del RNA purificado**

Reactivo	$\mu\text{L}$
Quantiscript Reverse Transcriptase	1
Quantiscript RT Buffer	4
RT Primer Mix	1

Una vez realizada la transcripción reversa, siguiendo la tabla 4, para preparar el *mix* de reacción, se añadieron la *Master mix* de TB Green® Premix EX Taq™ kit (Takara, Shiga, Japan) y los *primers* a 10 ng de cDNA. La PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR por sus siglas en inglés) se llevó a cabo en un ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), con 60 °C como temperatura de anillamiento y 40 ciclos de amplificación. Las muestras se cargaron por duplicados.

**Tabla 4. Descripción de la *Master mix* de reacción usado para la RT- PCR**

Reactivo	$\mu\text{L}$
DNA	2
ROX Dye II (50X)	0.2
Primer Sense (10X)	0.3
Primer Antisense (10X)	0.3
DNA master SYBR Premix Ex Taq Takara (2X)	5
H <sub>2</sub> O	2.2

Los valores de expresión fueron cuantificados usando el método  $2^{-\Delta\Delta C}$  y normalizados con los niveles de expresión de los diferentes *housekeeping genes* utilizados. En la tabla 5 se observan las secuencias de DNA de los oligonucleótidos utilizados para la reacción de RT-qPCR, *LSM4*,  *$\beta$ -2-microglobulina ( $B2M$ )*,  *$\beta$ -actina* y *gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*)*.

**Tabla 5. Secuencias de los *primers* utilizados en la RT-qPCR**

Gen	Sentido	Antisentido
<i>LSM4</i>	CGGCACCATGTTGGTGGA	CCTGGACGTGCAGATGACTT
<i>B2M</i>	AAGCAGCATCATGGAGGTTTG	GAGCTACCTGTGGAGCAACC
<i><math>\beta</math>-actina</i>	GACCCAGATCATGTTTGAGACC	CTTCATGAGGTAGTCAGTCAGG
<i>GAPDH</i>	ATGCTGGCGCTGAGTACGTC	GGGCAGAGATGATGACCCTT

### 3.2.4. Western blot

Se sembraron  $1.5 \times 10^6$  células en placas de 100 mm y se incubaron a 5%  $\text{CO}_2$  y 37 °C durante 48 h. Pasado este tiempo, se reemplazó el medio y se añadió PBS 1 X frío. La extracción de proteínas se realizó añadiendo a cada placa 150  $\mu\text{L}$  del *buffer* de lisis (1 mL de RiPA *buffer* contiene 0.25 mM de  $\beta$ -glicerofosfato, 1 mM de DTT, 4  $\mu\text{M}$  de leupeptina, 40  $\mu\text{M}$  de PMSF, 100  $\mu\text{M}$  de caliculina, 1  $\mu\text{M}$  de ortovanadato de sodio, y 0.4  $\mu\text{M}$  de pepstatina). Se levantaron las células y el lisado se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. A continuación, el lisado se dejó incubar en hielo durante 30 min y se centrifugó a máxima velocidad durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo Eppendorf y se midió la concentración de proteínas usando el Pierce™ BSA Protein Assay kit (Thermo Scientific), según las instrucciones del fabricante.

Las muestras de proteína se prepararon a una concentración final de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , de forma que en un gel al 4-15% de poliacrilamida (Bio-Rad Laboratories Inc.) se cargaron y separaron 20  $\mu\text{g}$  de proteína. Seguidamente, el gel, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories Inc.). Para evitar uniones inespecíficas, se bloqueó la membrana haciendo uso de *Tris-buffered saline-Tween* (TBS-T) al 1 X (100 mL de TBS 10 X (200 mM de Tris pH = 7.5, 1.5 M de NaCl), 900 mL  $\text{H}_2\text{O}$ , 1 mL de Tween 20%) con 5% de leche descremada a temperatura ambiente (RT por sus siglas en inglés) durante 1 h. A continuación, la membrana, se incubó durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario (diluido 1:1000 en TBS-T 1X con 5% de BSA). En la tabla 6 se pueden observar los anticuerpos primarios utilizados para detectar LSM4 (Abcam) y GAPDH (Cell Signaling).

**Tabla 6. Anticuerpos utilizados en el Western blot**

Anticuerpo	Número de referencia de fabricación	Dilución
LSM4	153959 (Abcam)	1:1000
GAPDH	2118 (Cell Signaling Technology)	1:1000

Tras la incubación, se lavó la membrana con TBS-T 1 X durante 10 min a RT, repitiéndolo 3 veces. Luego, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (diluido 1:10.000 en TBS-T 1 X con 5% de leche descremada) a RT durante 1 h y pasado ese tiempo se realizaron 3 lavados de 10 min con TBS-T 1 X a RT. El anticuerpo secundario IgG anti-conejo proveniente de cabra conjugada con peroxidasa de rábano se adquirió de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Inc.) Después, se utilizó un transiluminador como sistema mejorado de detección de quimioluminiscencia (ECL por sus siglas en inglés) (Bio-Rad Laboratories Inc.) para detectar las bandas en el gel, según las instrucciones

del fabricante. La cuantificación proteica se realizó haciendo uso del programa Image Lab (Bio-Rad), normalizando las intensidades de banda de cada muestra con su respectivo control de carga.

### 3.3. GENERACIÓN DE LSM4 KNOCKDOWN

#### 3.3.1. Plásmidos shRNA

Las construcciones shRNA fueron obtenidas de Horizon Discovery Group plc (Cambridge, Reino Unido). En la tabla 7 se puede observar la información de cada vector utilizado.

**Tabla 7. Construcciones shRNA usadas para el gen LSM4**

Nombre	Vector	Zona diana	Secuencia	Referencia
sh-C	pLKO.1	-	-	-
sh-8	pLKO.1	3'UTR	TTTCTAACCGGAGAATTGCCG	TRCN0000072308
sh-11	pLKO.1	ORF	TAATGTTTCATCCAGTTGTCGC	TRCN0000072311
sh-12	pLKO.1	ORF	TTCTCGCAGGTTAATGTTTCAT	TRCN0000072312

#### 3.3.2. Preparación de plásmidos

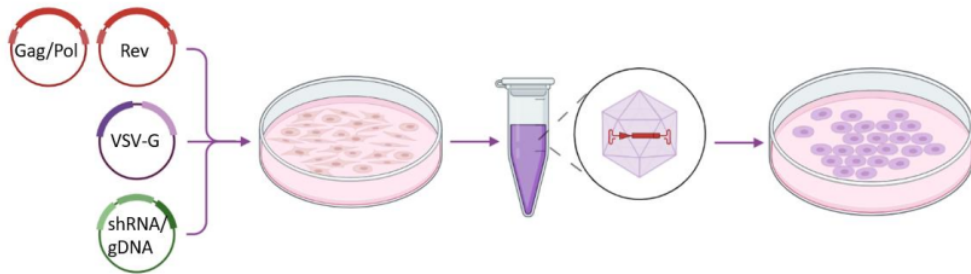
Para clonar los vectores lentivirales se utilizaron DH5α *Escherichia coli* (*E. coli*) competentes. Las bacterias se descongelaron y se mantuvieron en hielo a no ser que se indicara lo contrario. Durante todo el procedimiento se mantuvieron condiciones asépticas. Para la replicación de los plásmidos, 50 µL de *E. coli*, que contenía el vector, fueron plaqueadas en placas de LB agar (0.5% de extracto de levadura, 1% de triptona, 1% de NaCl, 1% de agar, 1:1.000 de ampicilina) autoclavado, haciendo uso de asas de siembra. Seguidamente, las placas fueron incubadas en un incubador estático a 37 °C durante toda la noche.

La purificación de los plásmidos se realizó siguiendo un protocolo interno descrito en el Anexo 2. Brevemente, haciendo uso de un asa de siembra estéril, una única colonia de cada placa fue recogida e inoculada en 3 mL de medio LB autoclavado con 1:1.000 de ampicilina. El cultivo bacteriano se mantuvo en un incubador agitado a 37 °C hasta el final del día. Luego, 500 µL de cada cultivo se transfirieron a 250 mL de medio LB, y se mantuvo en agitación a 37 °C toda la noche. Al día siguiente, los plásmidos se extrajeron haciendo uso de diferentes soluciones realizadas en fresco, varios ciclos

de incubación y varios ciclos de centrifugación. Se precipitó el DNA y se transfirió a un Eppendorf con etanol al 70%. Los microtubos se centrifugaron a máxima velocidad a 4 °C durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y el pellet se dejó secar toda la noche. Finalmente, el pellet fue resuspendido en *buffer* Tris-EDTA 1 X y se cuantificó el DNA usando el nanodrop.

### 3.3.3. Generación lentiviral

Se siguió un protocolo interno para la producción viral, tal y como se representa en la figura 3. Se proporcionaron todos los plásmidos requeridos para la transfección de HEK 293T, incluido el sistema de empaquetamiento, separado en dos plásmidos, uno codificando proteínas Rev y otro Gag y Pol, y el plásmido de la envoltura (VSV-G).



**Figura 3. Estrategia de producción de lentivirus.** Representación esquemática de la transfección de células HEK 293T con plásmidos de empaquetamiento y de la envoltura para formar partículas virales, así como el plásmido de transferencia que contiene el vector de interés. Después de quitar y reemplazar el medio con medio fresco, las partículas virales se pueden aislar pasadas 48-72 h y ser usadas para la infección celular.

Para cada vector lentiviral,  $1.5 \times 10^6$  células HEK 293T fueron sembradas en placas de 100 mm, y se dejaron incubar durante toda la noche. Al día siguiente, las construcciones de Gag/Pol, Rev y los plásmidos VSV-G fueron descongelados en hielos. Para cada vector lentiviral, se preparó un *Mix* de transfección con 544  $\mu$ L de DMEM libre de suero y 24  $\mu$ L de FuGENE, mezclado por inversión e incubado durante 5 min a RT. Pasado el tiempo de incubación del *Mix*, se preparó y añadió a cada *Mix* una solución de DNA de 20  $\mu$ L, que contenía 0-4  $\mu$ g de VSV-G, 3.7  $\mu$ g de Gag/Pol, 3.7  $\mu$ g de Rev y 4.2  $\mu$ g de vector lentiviral en H<sub>2</sub>O estéril. Se mezcló por inversión y se dejó incubar 25-30 min a RT. Después de la incubación, la reacción de transfección se añadió a las células gota a gota y se incubó con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Después de 7 h se reemplazó el medio y se dejaron incubar las células 2 días.

#### **3.3.4. Infección celular**

2 días antes de la infección, <sup>1</sup> se sembraron 300.000 células en placas de 6 pocillos y se incubaron con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. 48 h después de la transfección, se aislaron las partículas lentivirales del medio de las células HEK 293T, se filtró el medio con un filtro de jeringuilla de 0.45 µm, y se centrifugó a 300 g durante 3 min. Seguidamente, después de quitar el medio, las células fueron infectadas con cada lentivirus empaquetado, añadiendo 2 mL del sobrenadante filtrado y 4 µg/mL del reactivo de transfección (Polibreno). El medio de infección fue reemplazado después de 7-8 h con medio de cultivo (2 mL por pocillo). 24 h después de la infección, las células se seleccionaron utilizando una concentración de puomicina de 1 µg/mL, manteniendo las mismas condiciones durante los futuros pases celulares.

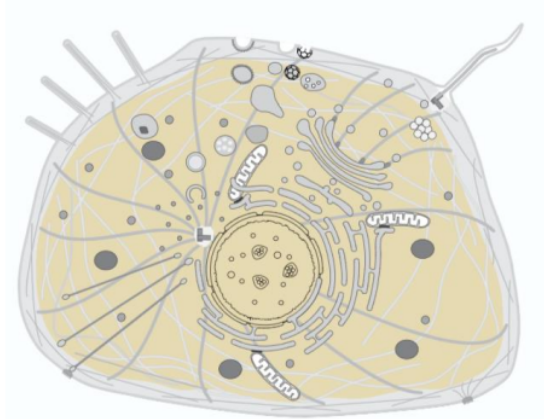




## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

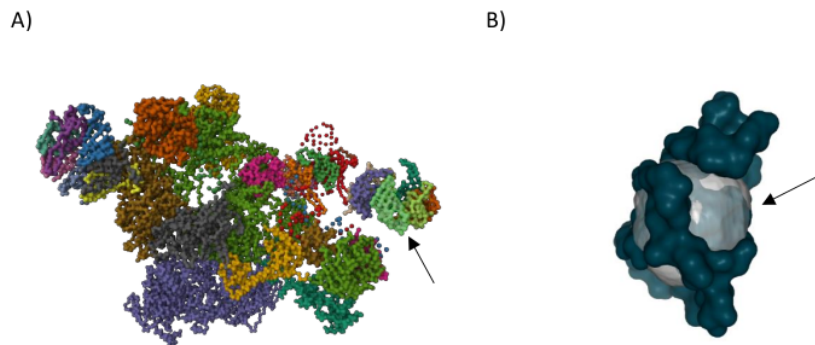
### 4.1. POTENCIAL DRUGGABILITY DE LSM4

Para poder estudiar *in vitro* el potencial como diana terapéutica de LSM4 en CaP es necesario conocer en primer lugar su *druggability*. La proteína LSM4 se encuentra localizada tanto en el núcleo como en el citoplasma, tal y como se muestra representado en la figura 4, presenta un peso molecular de 15 kDa y está formada por 139 aminoácidos (UniProt Consortium, 2023).



**Figura 4. Localización subcelular de LSM4.** Representación esquemática de la localización subcelular de LSM4, se indica en amarillo la localización de LSM4, mostrando que se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma. La imagen fue obtenida de la base de datos UniProt.

Tras buscar en distintas bases de datos la estructura tridimensional de LSM4, se identificaron varias estructuras cristalizadas con una resolución de entre 5 y 7 Å, la mayoría de ellas determinadas por microscopía electrónica (ME), y tanto en complejo como de forma aislada. En la figura 5A se representa la estructura del complejo U4/U6.U5 tri-snRNP (PDB ID: 3JCR), del cual forma parte LSM4, y que ha sido determinada por ME a una resolución de 7.00 Å. Por otra parte, LSM4 ha sido aislada por ME a una resolución de 5.7 Å, observado en la figura 5B (canSAR ID: 6AH0\_s), y la base de datos canSAR ha predicho una región apta de unión a ligando, a pesar de que no se han descrito inhibidores o ligandos asociados contra LSM4. En su algoritmo predictivo, canSAR se basa en el estudio de ciertas características como el volumen, la zona de unión, los donadores de puentes de hidrógeno y regiones hidrofóbicas, entre otros, para predecir potenciales sitios de unión en la estructura tridimensional de la proteína de estudio (Coker *et al.*, 2019).



**Figura 5. Estructura 3D del PDB ID: 3JCR.** A) La estructura del complejo U4/U6.U5 tri-snRNP en la que LSM4 está representada con verde claro (indicada con una flecha). La imagen fue obtenida de la base de datos PDB. B) Estructura de la subunidad LSM4, presentando la cavidad con potencial de unión de ligando basado en las predicciones de canSAR (indicado con una flecha). La imagen fue obtenida de la base de datos de canSAR.

En base a las características físicas, químicas, estructurales y de localización descritas anteriormente. Se podría considerar que LSM4 es una proteína susceptible de ser modulada por un fármaco. El hecho de que se encuentre en el citoplasma la hace mucho más accesible a la acción de un fármaco, a diferencia de si se encontrara únicamente en el núcleo. Presenta un pequeño tamaño, lo que podría facilitar la expresión de la proteína recombinante a través de vectores plasmídicos *in vitro*. Por último, poseer su estructura cristalizada ha permitido conocer zonas de potencial unión de ligandos, lo que podría indicar que la actividad de LSM4 puede ser modulada mediante moléculas de pequeño tamaño.

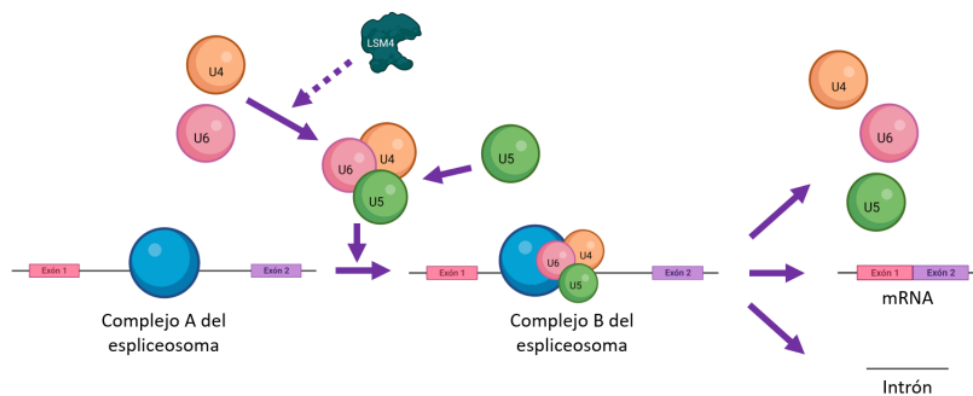
#### **4.2. EVALUACIÓN DE LSM4 COMO DIANA TERAPÉUTICA EN CÁNCER DE PRÓSTATA**

LSM4 codifica para una pequeña ribonucleoproteína nuclear (snRNP) miembro de la familia LSM de unión al RNA. Esta proteína presenta dos funciones principales: en el núcleo, está implicada en el *splicing* del pre-mRNA; mientras que, en el citoplasma, participa en el ensamblaje de los cuerpos de procesamiento (*P-bodies* o PB por sus siglas en inglés) (Li *et al.*, 2023; Yin *et al.*, 2021).

##### **4.2.1. Papel de LSM4 en el *splicing***

LSM4 está implicada en el *splicing* del pre-mRNA al mediar, tal y como se muestra en la figura 6, la formación de la snRNP U4/U6 (Yin *et al.*, 2021). El proceso de *splicing* permite obtener distintos mRNA a partir de un mismo pre-mRNA, dando lugar a un mayor número de transcritos a partir de un

único gen. Este proceso de eliminación de intrones y la transformación del pre-mRNA en un mRNA codificante para una proteína se lleva a cabo en el espliceosoma, complejo del que forman parte las proteínas de la familia LSM (Lee & Rio, 2015; Will & Lührmann, 2011). El espliceosoma es un gran complejo RNP que participa en el proceso de *splicing* a través de una serie de activaciones y ensamblajes que debe de sufrir el propio espliceosoma antes de la catálisis. Estas modificaciones y ensamblajes deben ocurrir repetidamente en cada proceso de *splicing*. El espliceosoma está compuesto por cinco snRNP, U1, U2, U4/U6 y U5 (Lee & Rio, 2015; Zhan *et al.*, 2018). De esta manera, cualquier mutación en alguno de los componentes del espliceosoma, puede llevar a alteraciones en el proceso de *splicing*, afectando a la traducción de genes (aumentando el número de *nonsense*-mRNA) o produciendo proteínas aberrantes (Yang *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2020).



**Figura 6. Papel de LSM4 en el proceso de *splicing*.** Representación esquemática del mecanismo de acción de LSM4 en la unión de U4/U6 snRNP para dar lugar al U4/U6.U5 tri-snRNP. Este complejo se une al complejo A del espliceosoma formado anteriormente para dar lugar al complejo B del espliceosoma, con la posterior liberación de un mRNA maduro. La flecha discontinua indica una implicación en el proceso, pero se desconoce el mecanismo exacto.

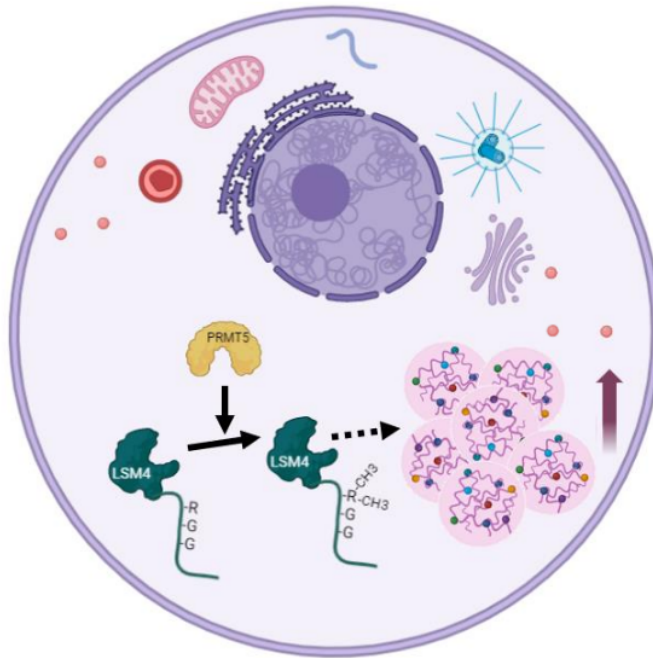
En cáncer, las alteraciones en el proceso de *splicing* pueden contribuir a la progresión tumoral. En concreto, se ha visto que mutaciones en los componentes del espliceosoma puede llevar a alteraciones en la señalización de células tumorales y suponer cambios en la iniciación y progresión tumoral (Dvinge *et al.*, 2016; Zhang & Manley, 2013). En el Proyecto Genoma del Cáncer, después de analizar y secuenciar una gran variedad de tumores, se encontraron mutaciones somáticas en genes encargados del reconocimiento de los sitios de *splicing* 3' (Lee & Rio, 2015; Makishima *et al.*, 2012). Sin embargo, el reto se centra actualmente en encontrar asociaciones causales entre diferentes patrones de *splicing* y determinados fenotipos tumorales (Lee & Rio, 2015). Además, se ha

comprobado que muchos de los genes involucrados en otorgar las características propias de las células tumorales (características conocidas como *hallmarks* del cáncer) sufren variaciones en su *splicing*, lo que convierte a las propias alteraciones en el *splicing* alternativo en un *hallmark* emergente del cáncer (Sveen *et al.*, 2016).

En el caso concreto del CaP, existen alteraciones en el número de copias de, al menos, el 70% de los genes que codifican para subunidades del espliceosoma o proteínas asociadas (Zhang *et al.*, 2020). Además, la retención de intrones supone la característica principal de modificaciones en CaP, estando asociado positivamente con la agresividad y severidad del cáncer, especialmente en casos metastásicos resistentes a la castración (Zhang *et al.*, 2020). Por otra parte, otro de los mecanismos asociados a la progresión del CaP en casos resistentes a la castración son las variaciones en el *splicing* de AR, siendo AR-V7 la variación más estudiada (Konda & Viswanathan, 2022). AR-V7 carece del dominio de unión al ligando debido a la pérdida de los exones 4 al 8 presentes en el AR no mutado. Esto provoca que AR-V7 se encuentre constantemente translocándose al núcleo sin unirse a su ligando, lo que supone la expresión continua de genes regulados por AR, muchos de ellos relacionados con la proliferación del CaP. Además, puede unirse a diferentes regiones del DNA promoviendo la expresión de distintos genes, que puede contribuir a su papel pro-tumoral, aunque el mecanismo exacto de acción permanece desconocido (Konda & Viswanathan, 2022; Westaby *et al.*, 2022).

#### 4.2.2. Papel de LSM4 en los *P-bodies*

Además de su papel en el proceso del *splicing*, LSM4 también ha sido relacionado con el ensamblaje de los *P-bodies*, tal y como se observa en la figura 7. En este contexto, LSM4 presenta un dominio rico en arginina y glicina (dominio RGG) en su extremo C-terminal, el cual, cuando se encuentra dimetilado, promueve la formación de los *P-bodies* (Arribas-Layton *et al.*, 2016). Los *P-bodies* son orgánulos citoplasmáticos no membranosos de RNA y proteínas que participan en la regulación de la traducción a través de la acumulación de mRNA traduccionalmente reprimidos junto con factores encargados de la degradación del mRNA, por tanto, dado el papel de LSM4 en el ensamblaje de los *P-bodies*, LSM4 participa, de manera indirecta, en este proceso de regulación traduccional (Arribas-Layton *et al.*, 2016; Briggs *et al.*, 2021; Riggs *et al.*, 2020). De esta forma, los *P-bodies* son considerados los centros de degradación o almacenamiento del mRNA, especialmente en situaciones de estrés (Nsengimana *et al.*, 2022).



**Figura 7. Papel de LSM4 en la formación de los *P-bodies*.** Representación esquemática de la dimetilación del dominio arginina-glicina-glicina (RGG) de LSM4 mediado por la acción de la arginina dimetiltransferasa PRMT5. La dimetilación de estos dominios promueven la formación de los *P-bodies*. La flecha discontinua indica una implicación en el proceso, pero se desconoce el mecanismo exacto. La flecha roja indica un aumento, en este caso, en la formación de los *P-bodies*.

En cáncer, los *P-bodies* pueden proporcionar a las células cancerosas una vía de protección para hacer frente a las condiciones adversas del entorno tumoral (Lavalée *et al.*, 2021). Se ha observado que los *P-bodies* participan en el desarrollo del cáncer, pues se ha observado una asociación entre la formación de los *P-bodies* y la transición epitelio-mesénquima, así como una participación de los *P-bodies* en la metástasis y la degradación de genes supresores de tumores (Nsengimana *et al.*, 2022). Este papel en la progresión tumoral en distintas fases convierte a los *P-bodies* y a las proteínas involucradas en su formación en posibles dianas terapéuticas (Lavalée *et al.*, 2021).

Por otra parte, si bien no se han encontrado relaciones directas que demuestren la acción de los *P-bodies* en el progreso del CaP, sí que existen estudios en CaP que relacionan genes específicos que intervienen en el funcionamiento de los *P-bodies*, como *ORF1p* o *LINE-1*, provocando una deslocalización de los *P-bodies*, lo que puede interferir en su papel en el tumor (Briggs *et al.*, 2021).

#### 4.2.3. Efecto de LSM4 en cáncer

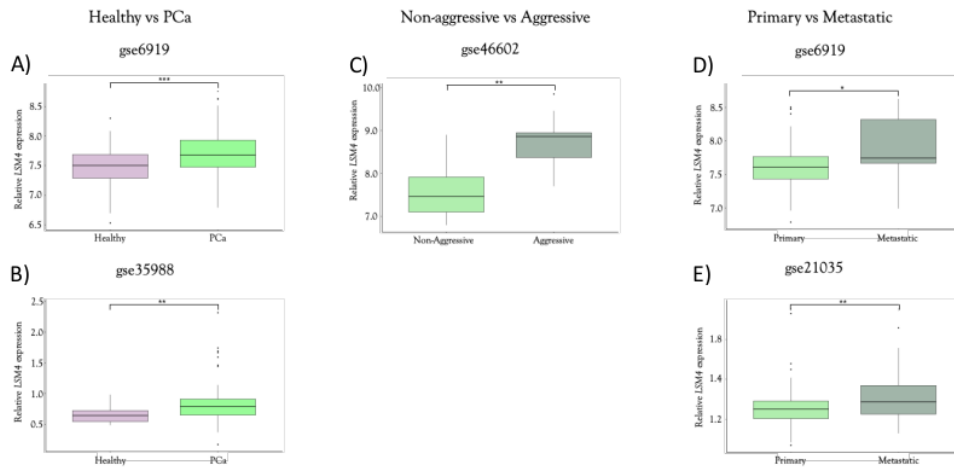
LSM4 se ha visto involucrado en el desarrollo y malignidad del cáncer de mama (BC), cáncer de páncreas (PC), cáncer de ovario (OC) y carcinoma hepatocelular (HCC) (Chen *et al.*, 2021). En el caso concreto del OC, se ha demostrado una relación de LSM4 con circ\_0025033, un RNA circular (circRNA) que funciona como oncogen al presentar como diana el micro RNA miR-184, que a su vez presenta una zona de unión con LSM4; de esta manera, circ\_0025033 promueve el desarrollo del OC al inhibir miR-184 y por tanto sobre-expresar LSM4 (Hou & Zhang, 2021). En HCC, LSM4 también se ha correlacionado con una peor supervivencia de los pacientes. Además, se han observado efectos de sinergia con genes co-expresados, como *CCDC124* o *TXNL4A*, relacionados con promover el crecimiento y la metástasis en modelos celulares de HCC, a través de la regulación del ciclo celular, la adhesión focal y el metabolismo de los ácidos grasos (Chen *et al.*, 2021).

Toda esta información sugiere que LSM4 puede tener un efecto en la proliferación de distintos cánceres. Sin embargo, no existen estudios que relacionen directamente LSM4 con CaP, por lo que resulta esencial estudiar el papel que juega LSM4 en las variaciones de *splicing* existentes en CaP, así como en la formación de los *P-bodies* y poder así caracterizarlo como posible diana terapéutica en CaP.

#### 4.2.4. LSM4 está sobre-expresado en cáncer de próstata y está correlacionado con el pronóstico del paciente

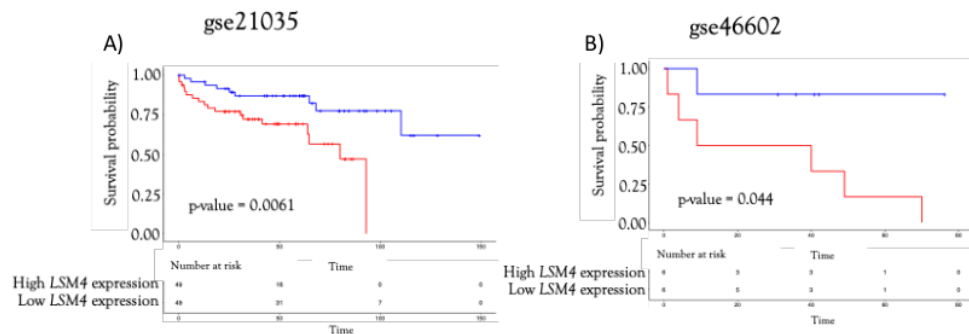
El análisis de expresión diferencial realizado en este estudio mostró, tal y como se muestra en la figura 8A y 8B, que *LSM4* presentaba una mayor expresión en las muestras de tejido de CaP en comparación con el tejido sano. Además, en las figuras 8C-E se pudo observar que *LSM4* estaba significativamente sobre-expresado en muestras obtenidas de tumores agresivos y metastásicos si las comparamos con las muestras de tejido indolente y primario, respectivamente.





**Figura 8. *LSM4* está sobre-expresado en CaP.** A) y B) Expresión relativa en CaP y tejido sano basado en los datos de transcriptómica de los estudios gse6919 y gse35988 disponibles públicamente en el repositorio GEO. C), D) y E) Expresión relativa en diferentes estadios de CaP basado en los datos de transcriptómica de los estudios gse46602, gse6919 y gse21035 disponibles públicamente en el repositorio GEO. \*\*\* p-value <0.001, \*\* p-value <0.01 y \* p-value <0.5 contra el grupo de referencia (Gómez-Cebrián, 2023, p. 201.).

Por otro lado, en el análisis de correlación entre la expresión de *LSM4* y la progresión de la enfermedad, se pudo observar que su expresión estaba significativamente correlacionada con un peor pronóstico, ya que una mayor expresión de *LSM4* estaba asociada a un menor tiempo libre de RB (*BCR-free time*), como se muestra en la figura 9A y 9B.



**Figura 9. *LSM4* está asociado con la progresión del CaP.** A) y B) Curva Kaplan-Meier basado en los datos de transcriptómica de los estudios gse21035 y gse46602 disponibles públicamente en el repositorio GEO (Gómez-Cebrián, 2023, p. 201.).



#### 4.3. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES RELATIVOS DE LSM4 EN MODELOS CELULARES DE PRÓSTATA

Para validar la relevancia de LSM4 en el desarrollo y/o progresión del CaP, se evaluaron sus niveles relativos de mRNA y proteína en distintos modelos celulares de próstata. En primer lugar, se llevó a cabo un análisis de sus niveles de expresión en 5 líneas celulares utilizando *B2M* como *housekeeping gene*, tal y como se observa en la figura 10A.

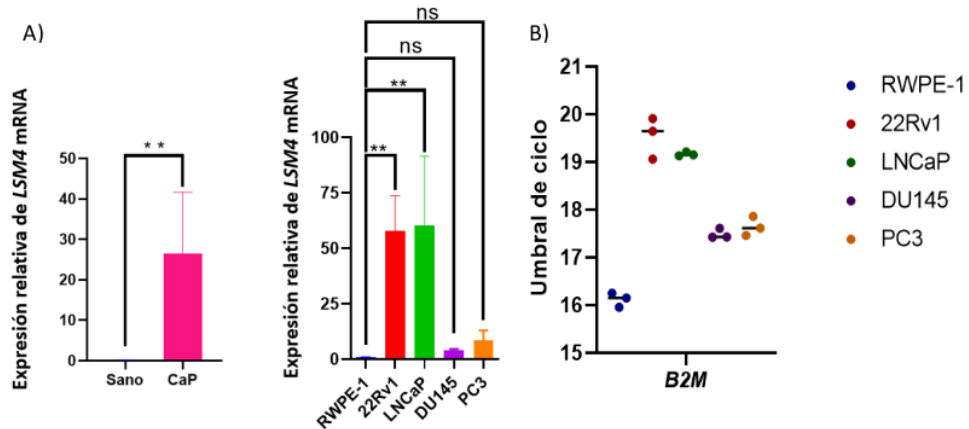


Figura 10. Niveles de expresión relativa de *LSM4* a nivel de mRNA utilizando *B2M* como *housekeeping gene*. A) Niveles de expresión relativa entre el modelo celular sano (RWPE-1) y CaP. B) Valores de umbrales de ciclo (Ct) de *B2M*. Los resultados de la qPCR están expresados como la media  $\pm$  error estándar (ES). \*\* p-value <0.01 contra el grupo de referencia.

En un estudio previo comparando 16 genes comúnmente utilizados como *housekeeping gene* en dos líneas celulares de CaP (LNCaP y 22Rv1), Vajda *et al.* (2013) demostraron que *B2M* mostraba una mayor estabilidad en condiciones de normoxia en comparación con otros *housekeeping genes* como *GAPDH* (Vajda *et al.*, 2013). En base a estos resultados, se decidió utilizar *B2M* como *housekeeping gene* en este estudio. Sin embargo, en el análisis de los datos crudos obtenidos en la RT-qPCR, al observar el umbral de ciclo (Ct por sus siglas en inglés) de *B2M*, tal y como se muestra en la figura 10B, este gen no presentaba valores homogéneos de Ct entre las distintas líneas celulares de próstata, por lo que se consideró que no se trataba de un buen *housekeeping gene* para estos modelos celulares.

Un *housekeeping gene* se define como aquel que es esencial para el correcto funcionamiento de la célula por lo que se debe expresar de manera homogénea independientemente del estado del ciclo celular en el que se encuentre, el estadio de desarrollo, o señales externas (Eisenberg & Levanon,

2013; Joshi *et al.*, 2022; Tu *et al.*, 2006). La elección de un buen *housekeeping gene* para estudios de RT-qPCR y cáncer, resulta esencial para obtener conclusiones correctas sobre las diferencias que se puedan observar entre las distintas muestras. Es importante tener en cuenta que el gen utilizado como *housekeeping* esté altamente expresado en la célula, y que el gen de estudio no interfiera en la expresión del *housekeeping gene* (da Conceição Braga *et al.*, 2022; Lemma *et al.*, 2016).

Debido a estos resultados, se dispuso a llevar a cabo una búsqueda bibliográfica de aquellos *housekeeping genes* más utilizados en estudios en CaP y poder determinar el *housekeeping gene* más adecuado para nuestro estudio. De acuerdo con la literatura, se encontraron como posibles candidatos  $\beta$ -actina y GAPDH (Altuna-Coy *et al.*, 2022; Gan *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2017; Lyu *et al.*, 2022; Nawas *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020). A continuación, para los potenciales *housekeeping genes*, se comprobó la especificidad de las secuencias de cada par de *primers*, recogidos de los estudios bibliográficos, haciendo uso de la herramienta online Primer-BLAST. Tras evaluar la especificidad de cada pareja de *primers*, en la figura 11 se representan las características de los *primers* escogidos.

A) **Primer pair 1**

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	GACCCAGATCATGTTTGAGACC	22	58.73	50.00
Reverse primer	CTTCATGAGGTAGTCAGTCAGG	22	57.62	50.00

Products on target templates  
>NM\_001101.5 Homo sapiens actin beta (ACTB), mRNA

product length = 217  
 Forward primer 1 GACCCAGATCATGTTTGAGACC 22  
 Template 441 ..... 462

Reverse primer 1 CTTCATGAGGTAGTCAGTCAGG 22  
 Template 657 ..... 636

B) **Primer pair 1**

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%
Forward primer	ATGCTGGCGCTGAGTACGTC	20	62.89	60.00
Reverse primer	GGGCAGAGATGATGACCCTT	20	59.16	55.00

Products on target templates  
>NM\_001357943.2 Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), transcript variant 7, mRNA

product length = 105  
 Forward primer 1 ATGCTGGCGCTGAGTACGTC 20  
 Template 288 ..... 307

Reverse primer 1 GGGCAGAGATGATGACCCTT 20  
 Template 392 ..... 373

Figura 11. Resultados del Primer-BLAST para los *primers* seleccionados. A)  $\beta$ -actina. B) GAPDH.

Para comprobar cuál era el mejor *housekeeping gene*, fue necesario evaluar la expresión de los tres genes candidatos en las distintas líneas celulares de próstata y elegir aquel cuyos valores de Ct presentaran una menor dispersión entre líneas. Tras analizar los niveles de expresión de los tres genes en las distintas líneas celulares de próstata, se observó que *B2M* presentaba los niveles de expresión más dispares entre las distintas líneas celulares, tal y como se puede observar en la figura 12. Al comparar cada uno de los candidatos con *B2M*, se observó que tanto  $\beta$ -actina como *GAPDH* presentaban unos valores de expresión relativa más similares entre las distintas líneas celulares de próstata. Además, *GAPDH*, en comparación con  $\beta$ -actina, presentaba valores más homogéneos entre los distintos modelos celulares. En concreto, *B2M*,  $\beta$ -actina y *GAPDH* presentaban una desviación estándar de 1.51, 0.99 y 0.48, respectivamente. Por este motivo, se decidió que *GAPDH* podía ser utilizado como *housekeeping gene* en líneas celulares de próstata.

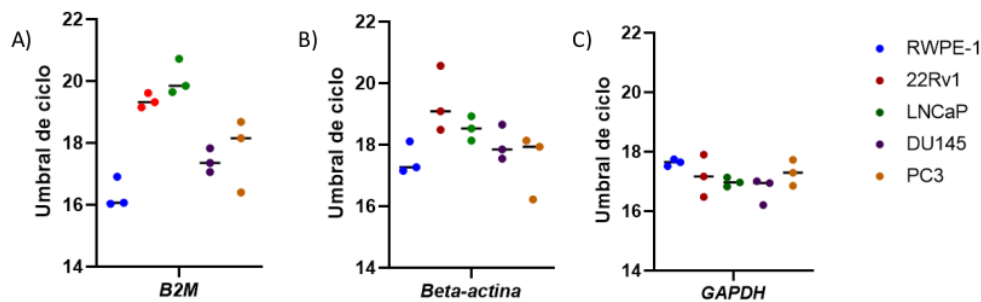
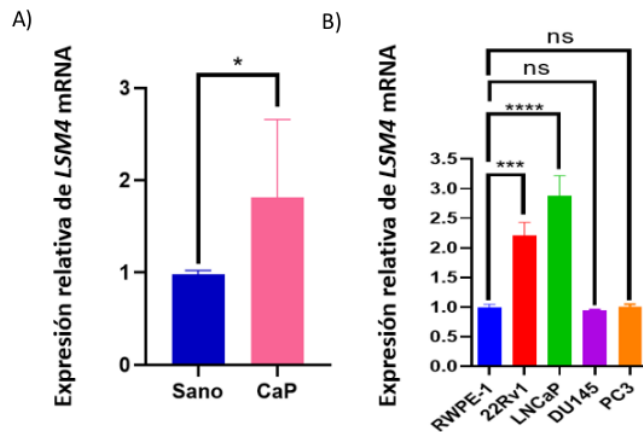


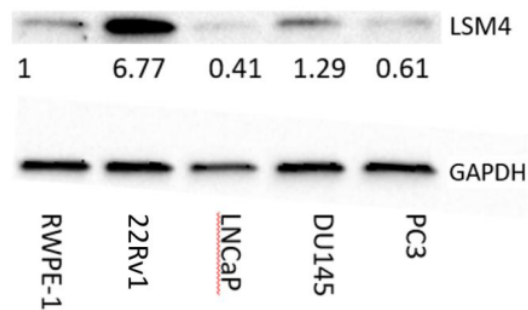
Figura 12. Representación gráfica de los umbrales de ciclo de los *housekeeping genes* en las RT-qPCRs. A) *B2M*. B)  $\beta$ -actina. C) *GAPDH*.

Tras la selección de *GAPDH* como *housekeeping gene*, se realizó una nueva RT-qPCR. Tal y como se muestra en la figura 13A, los resultados obtenidos indican que *LSM4* se encuentra significativamente sobre-expresado a nivel de mRNA en CaP comparado con el modelo celular sano de próstata RWPE-1, lo que valida el interés que presenta *LSM4* como potencial diana terapéutica en CaP. Por otro lado, como se muestra en la figura 13B, también se observó una mayor expresión de los niveles de *LSM4* en líneas dependientes de andrógeno (22RV1 y LNCaP) si lo comparamos con la línea celular sana (RWPE-1). En cambio, en las líneas castración resistentes (DU145 y PC3) los niveles de expresión relativa son similares a los que encontramos en la línea celular sana. En primera instancia, estos resultados pueden indicar que *LSM4* está relacionado con el desarrollo temprano del CaP, promoviendo la tumorigénesis y no tanto la progresión del tumor en estadios más avanzados, por lo que modular su acción podría evitar la transición a un estadio más agresivo.



**Figura 13. Expresión relativa de LSM4 a nivel de mRNA utilizando GAPDH como housekeeping gene.** A) Valores de expresión relativa entre el modelo celular sano (RWPE-1) y CaP. B) Entre las distintas líneas celulares de próstata. Los resultados de la RT-qPCR están expresados como la media  $\pm$  error estándar (ES). \*\*\*\* p-value <0.0001, \*\*\* p-value <0.001 y \* p-value <0.5 contra el grupo de referencia.

Seguidamente, para evaluar los niveles relativos de proteína LSM4 en las distintas líneas celulares de próstata, se realizó un *Western blot* utilizando GAPDH como control de carga. Tal y como se muestra en la figura 14, 22Rv1 era la línea celular de próstata con los mayores niveles relativos de LSM4, mientras que PC3 y sobre todo LNCaP, presentaban niveles relativos de LSM4 inferiores a los del modelo celular sano (RWPE-1). Además, se observaron discrepancias con respecto a los resultados obtenidos en la RT-qPCR, pues en este caso, los niveles de proteína son menores en LNCaP con respecto a la línea sana.



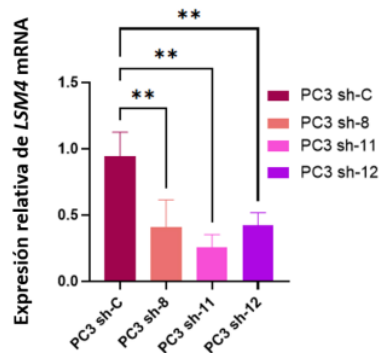
**Figura 14. Niveles relativos de LSM4 a nivel de proteína utilizando GAPDH como control de carga.** Los valores indican la cuantificación de las intensidades de bandas normalizadas, expresando los niveles relativos de proteína entre el modelo celular sano (RWPE-1) y las distintas líneas celulares de CaP.

Las líneas celulares de CaP son muy heterogéneas entre sí y presentan diferentes expresiones de proteínas, existiendo proteínas únicas para cada línea celular (Sardana *et al.*, 2008). Del mismo modo, las distintas líneas presentan metabolismos dispares, como en el uso de la glucosa (Sadeghi *et al.*, 2015) o en los procesos oxidativos (Higgins *et al.*, 2009). Por este motivo, es posible que entre líneas celulares de CaP existan diferencias en el procesado post-traducciona de ciertas proteínas que pueda conducir a observar esta discrepancia entre los niveles relativos de LSM4 a nivel de mRNA y a nivel de proteína en la línea celular LNCaP y no en 22Rv1.

#### **4.4.GENERACIÓN DE UN MODELO DE SILENCIAMIENTO DE LSM4 EN PC3**

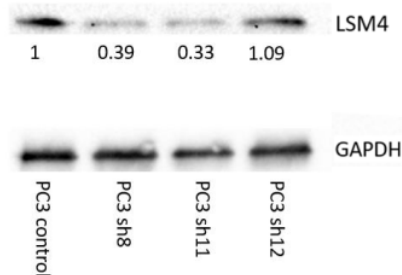
Finalmente, para estudiar el potencial de LSM4 en CaP, se decidió realizar un modelo *knockdown* del gen en dos líneas celulares de próstata, 22Rv1 y PC3. En este trabajo se presentarán los resultados del silenciamiento de LSM4 en la línea celular PC3. Se utilizaron un shRNA control (sh-C) y tres shRNAs diana de LSM4 (sh-8, sh-11 y sh-12) para los experimentos de infección lentiviral. Tras la selección de las células con puromicina, se estudió la efectividad del silenciamiento del gen.

Para confirmar el silenciamiento de LSM4 a nivel de mRNA, se realizó, en primer lugar, una RT-qPCR. En la figura 15 se pudo observar que, en comparación con el vector sh-C, las células infectadas con los vectores sh-8, sh-11 y sh-12 presentaban unos niveles de expresión de LSM4 a nivel de mRNA significativamente menores, con un silenciamiento del 71%, 75% y 60%, respectivamente. En concreto, si bien el silenciamiento del gen se produjo correctamente con los tres vectores, resultó ser más eficiente utilizando sh-11 como vector.



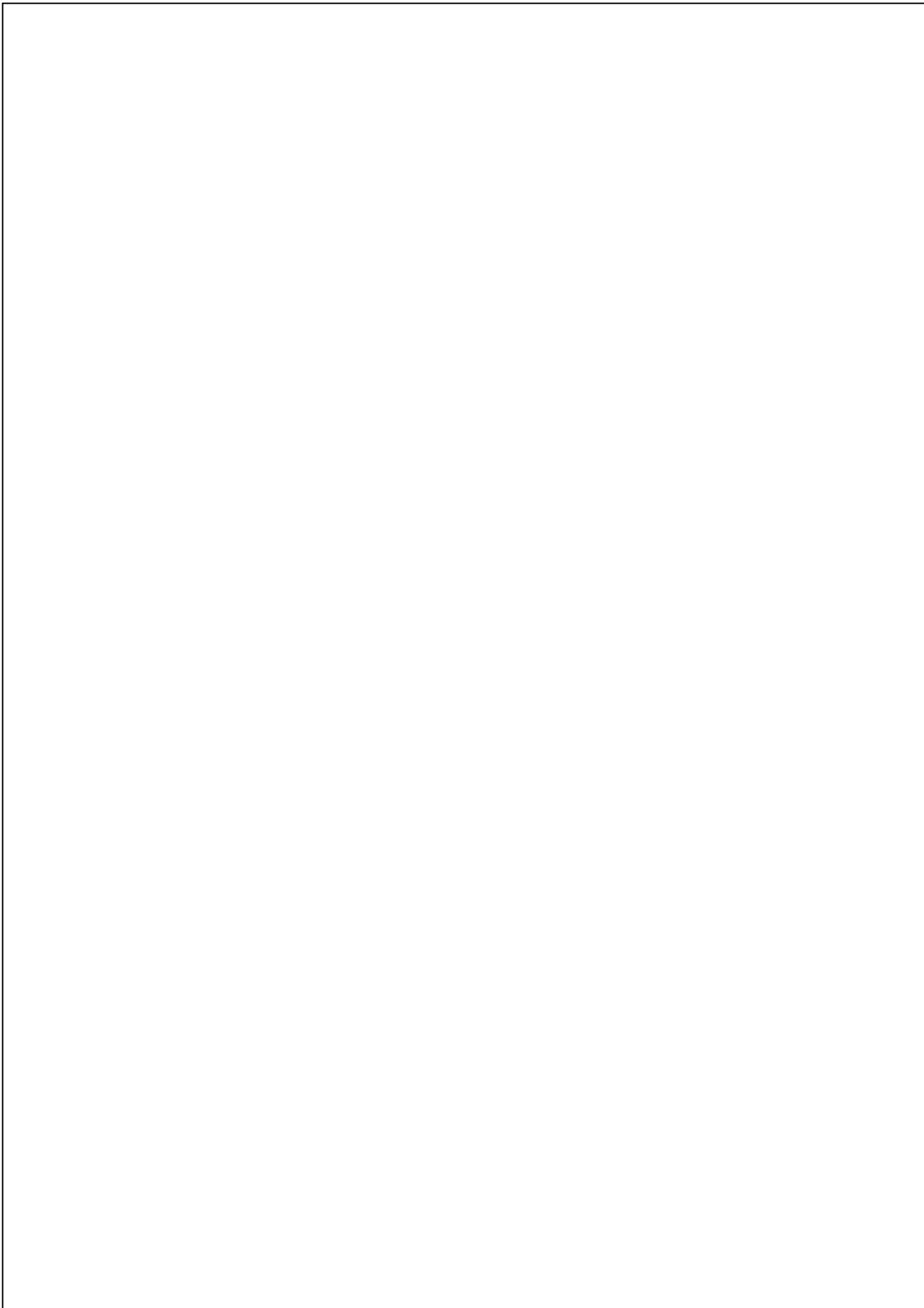
**Figura 15. Silenciamiento de la expresión a nivel de mRNA de LSM4 en la línea celular PC3 usando shRNA mediado por lentivirus.** Los resultados de la RT-qPCR están expresados como la media  $\pm$  error estándar (ES). \*\* p-value <0.01 contra el grupo de referencia.

Para comprobar los niveles de silenciamiento a nivel de proteína, se realizó un *Western blot*. En la figura 16, se observó que los niveles de proteína habían disminuido un 61% y 67% después del silenciamiento con sh-8 y sh-11, respectivamente, mientras que para sh-12 no se observaban diferencias en sus niveles de proteína, en comparación con el control. En conclusión, a nivel de proteína, LSM4 solo se encontraba silenciado después del uso de los vectores sh-8 y sh-11, si bien resultó ser más eficiente utilizando sh-11 como vector.



**Figura 16. Niveles relativos de proteína LSM4 en la línea celular PC3 después del silenciamiento del gen LSM4 usando shRNA mediado por lentivirus.** Los valores indican la cuantificación de las intensidades de bandas normalizadas, expresando los niveles relativos de proteína entre el modelo control (PC3 control) y los distintos shRNAs.

Estos estudios realizados sobre los niveles de LSM4 en líneas celulares de CaP demuestran la relevancia de LSM4 en el CaP. La generación de un modelo *knockdown* de LSM4 en líneas celulares de próstata, como la llevada a cabo en PC3, plantea la posibilidad de realizar futuros estudios que demuestren el papel que cumple LSM4 en el desarrollo del CaP.



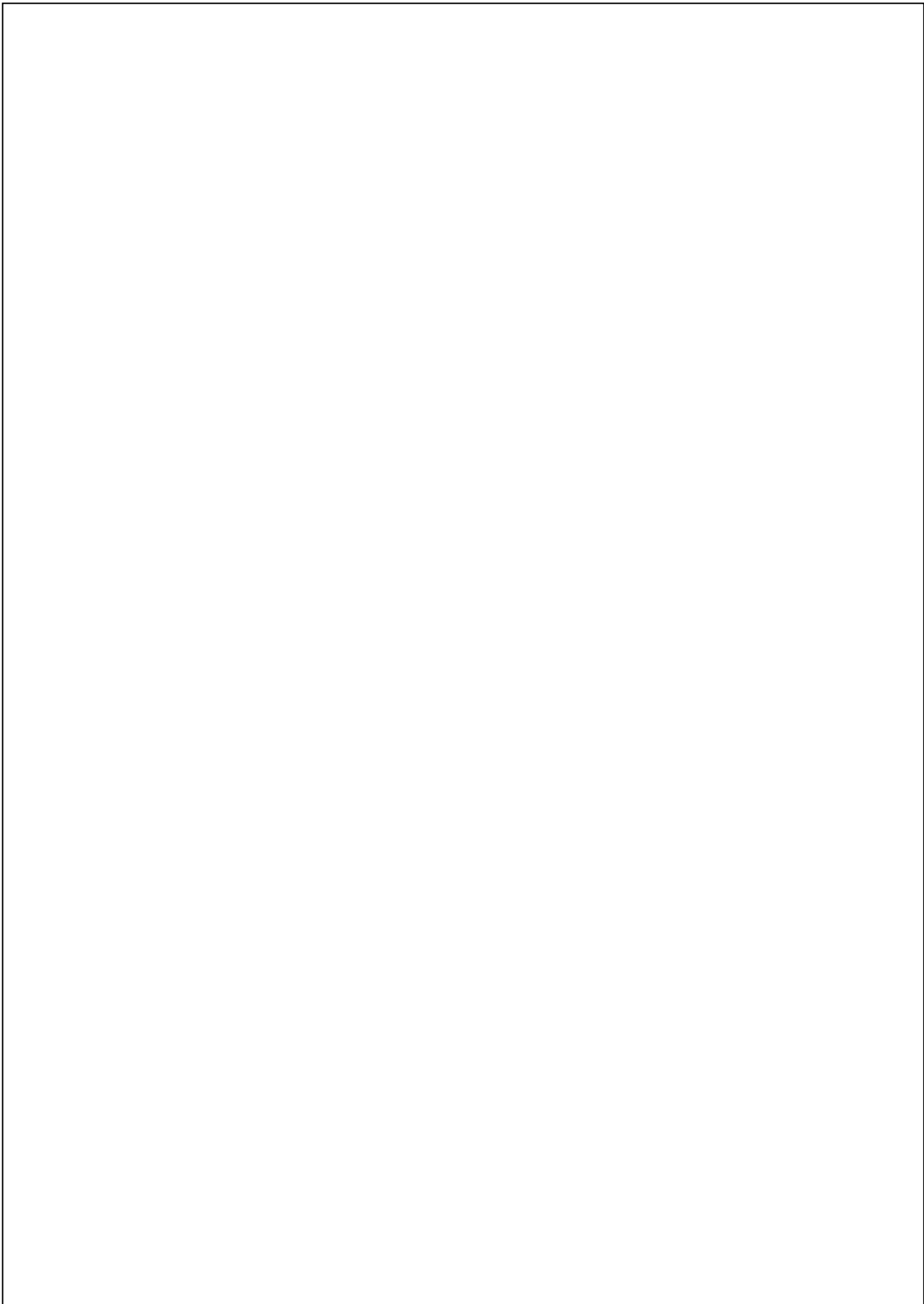
## 5. LÍNEAS FUTURAS

Debido a los resultados obtenidos en este trabajo, LSM4 podría ser considerado una buena diana terapéutica para el CaP. En este contexto, futuros proyectos podrían estar enfocados en estudiar el papel de LSM4 en la proliferación y migración en CaP a través del modelo *knockdown* generado del gen en la línea celular PC3 y la generación de un nuevo modelo en la línea celular 22Rv1.

Para llevar a cabo el estudio de LSM4 sobre PC3 y 22Rv1, una vez confirmado el silenciamiento mediante qPCR y *Western blot* en 22Rv1, tal y como se ha realizado en PC3, se debería evaluar el efecto de LSM4 en el crecimiento, proliferación, clonogenicidad y migración en CaP, a través de ensayos de MTS, formación de colonias y cicatrización de herida.

Estos resultados podrían esclarecer el papel de LSM4 en la tumorigenicidad en CaP, así como validar su potencial como diana terapéutica y plantear futuros estudios *in vivo*.

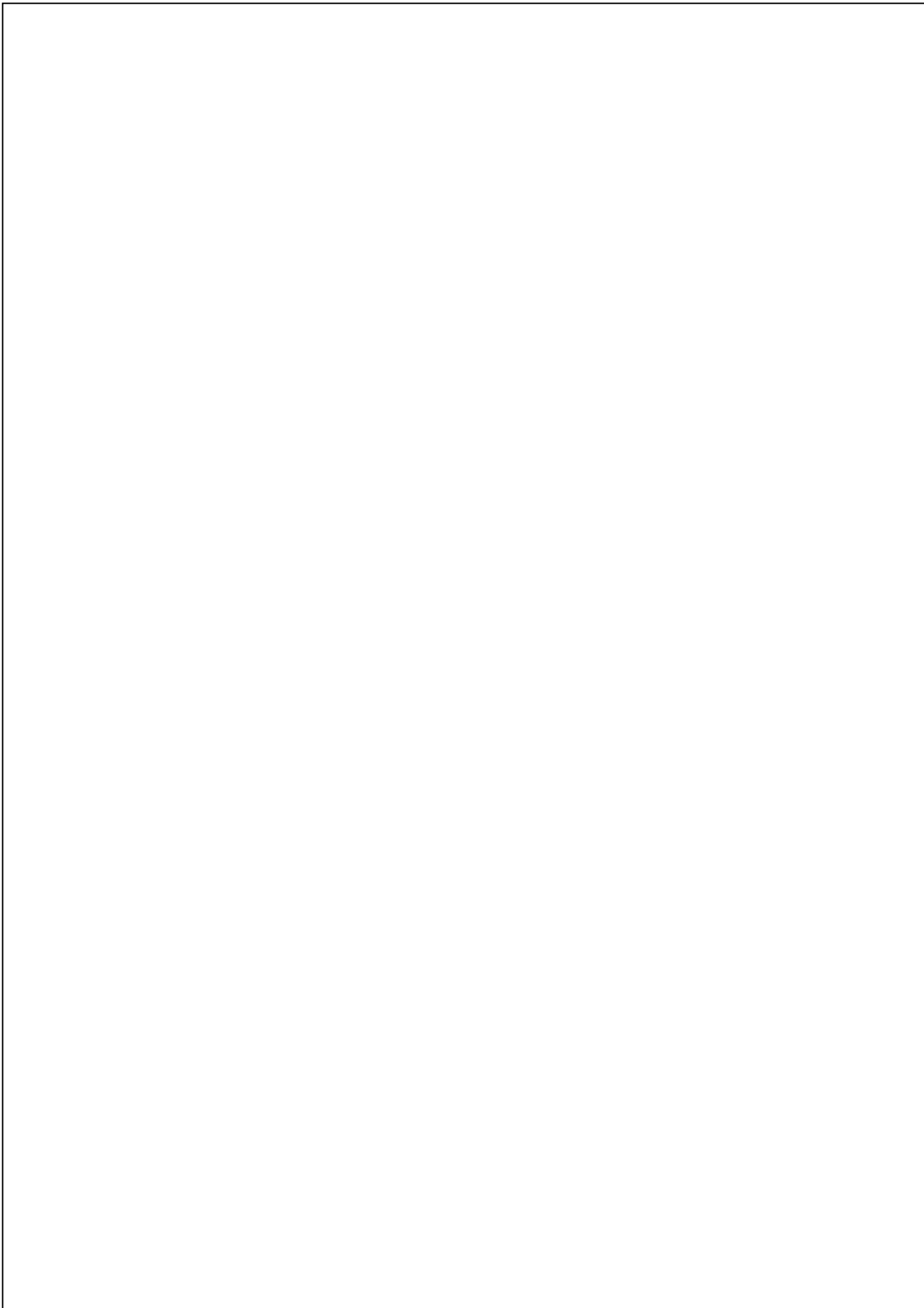




## 6. CONCLUSIÓN

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

1. Dado su papel en procesos relacionados con el cáncer, LSM4 presenta potencial como futura diana terapéutica para el tratamiento del CaP.
2. El tamaño, localización y estructura de LSM4 muestra características susceptibles para modular su actividad a través de la acción de un fármaco.
3. Los niveles elevados de LSM4 en CaP en comparación con el modelo celular sano refleja la importancia de LSM4 en el proceso tumoral.
4. Los vectores sh-8 y sh-11 presentan una mayor eficacia en el silenciamiento del gen *LSM4*, observado tras evaluar sus niveles relativos tanto de mRNA como de proteína en la línea celular PC3.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ALTUNA-COY, A., RUIZ-PLAZAS, X., SÁNCHEZ-MARTIN, S., ASCASO-TIL, H., PRADOS-SAAVEDRA, M., ALVES-SANTIAGO, M., BERNAL-ESCOTÉ, X., SEGARRA-TOMÁS, J., & R. CHACÓN, M. (2022). The lipidomic profile of the tumoral periprostatic adipose tissue reveals alterations in tumor cell's metabolic crosstalk. *BMC Medicine*, 20, 255. <https://doi.org/10.1186/s12916-022-02457-3>
- ATTARD, G., PARKER, C., EELES, R. A., SCHRÖDER, F., TOMLINS, S. A., TANNOCK, I., DRAKE, C. G., & DE BONO, J. S. (2016). Prostate cancer. *The Lancet*, 387(10013), 70-82. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61947-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61947-4)
- ARRIBAS-LAYTON, M., DENNIS, J., BENNETT, E. J., DAMGAARD, C. K., & LYKKE-ANDERSEN, J. (2016). The C-Terminal RGG Domain of Human Lsm4 Promotes Processing Body Formation Stimulated by Arginine Dimethylation. *Molecular and cellular biology*, 36(17), 2226–2235. <https://doi.org/10.1128/MCB.01102-15>
- BEHAN, F. M., IORIO, F., PICCO, G., GONÇALVES, E., BEAVER, C. M., MIGLIARDI, G., SANTOS, R., RAO, Y., SASSI, F., PINNELLI, M., ANSARI, R., HARPER, S., JACKSON, D. A., MCRAE, R., POOLEY, R., WILKINSON, P., VAN DER MEER, D., DOW, D., BUSER-DOEPNER, C., ... GARNETT, M. J. (2019). Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR-Cas9 screens. *Nature*, 568(7753), 511-516. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1103-9>
- BERMAN, H. M., WESTBROOK, J., FENG, Z., GILLILAND, G., BHAT, T. N., WEISSIG, H., SHINDYALOV, I. N., & BOURNE, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235-242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- BILAL, M., JAVAID, A., AMJAD, F., YOUSSEF, T. A., & AFZAL, S. (2022). An overview of prostate cancer (PCa) diagnosis: Potential role of miRNAs. *Translational Oncology*, 26, 101542. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101542>
- BRIGGS, E. M., MCKERROW, W., MITA, P., BOEKE, J. D., LOGAN, S. K., & FENYÖ, D. (2021). RIP-seq reveals LINE-1 ORF1p association with p-body enriched mRNAs. *Mobile DNA*, 12(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s13100-021-00233-3>
- BROWN, K. K., HANN, M. M., LAKDAWALA, A. S., SANTOS, R., THOMAS, P. J., & TODD, K. (2018). Approaches to target tractability assessment—a practical perspective. *Med. Chem. Comm.*, 9(4), 606-613. <https://doi.org/10.1039/c7md00633k>
- CARY, K. C., & COOPERBERG, M. R. (2013). Biomarkers in prostate cancer surveillance and screening: Past, present, and future. *Therapeutic Advances in Urology*, 5(6), 318-329. <https://doi.org/10.1177/1756287213495915>
- CHEN, L., LIN, Y.-H., LIU, G.-Q., HUANG, J.-E., WEI, W., YANG, Z.-H., HU, Y.-M., XIE, J.-H., & YU, H.-Z. (2021). Clinical Significance and Potential Role of LSM4 Overexpression in Hepatocellular

*Bibliografia*

- Carcinoma: An Integrated Analysis Based on Multiple Databases. *Frontiers in Genetics*, 12, 804916. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.804916>
- CHEUNG, H. W., COWLEY, G. S., WEIR, B. A., BOEHM, J. S., RUSIN, S., SCOTT, J. A., EAST, A., ALI, L. D., LIZOTTE, P. H., WONG, T. C., JIANG, G., HSIAO, J., MERMEL, C. H., GETZ, G., BARRETINA, J., GOPAL, S., TAMAYO, P., GOULD, J., TSHERNIAK, A., STRANSKY, N., ... HAHN, W. C. (2011). Systematic investigation of genetic vulnerabilities across cancer cell lines reveals lineage-specific dependencies in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(30), 12372–12377. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109363108>
- COKER, E. A., MITSOPOULOS, C., TYM, J. E., KOMIANOU, A., KANNAS, C., DI MICCO, P., VILLASCLARAS FERNANDEZ, E., OZER, B., ANTOLIN, A. A., WORKMAN, P., & AL-LAZIKANI, B. (2019). canSAR: Update to the cancer translational research and drug discovery knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D917-D922. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1129>
- COWLEY, G. S., WEIR, B. A., VAZQUEZ, F., TAMAYO, P., SCOTT, J. A., RUSIN, S., EAST-SELETSKY, A., ALI, L. D., GERATH, W. F., PANTEL, S. E., LIZOTTE, P. H., JIANG, G., HSIAO, J., TSHERNIAK, A., DWINELL, E., AOYAMA, S., OKAMOTO, M., HARRINGTON, W., GELFAND, E., GREEN, T. M., ... HAHN, W. C. (2014). Parallel genome-scale loss of function screens in 216 cancer cell lines for the identification of context-specific genetic dependencies. *Scientific data*, 1, 140035. <https://doi.org/10.1038/sdata.2014.35>
- DA CONCEIÇÃO BRAGA, L., GONÇALVES, B. Ô. P., COELHO, P. L., DA SILVA FILHO, A. L., & SILVA, L. M. (2022). Identification of best housekeeping genes for the normalization of RT-qPCR in human cell lines. *Acta Histochemica*, 124(1), 151821. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151821>
- DEHM, S. M., & TINDALL, D. J. (2011). Alternatively spliced androgen receptor variants. *Endocrine-Related Cancer*, 18(5), R183-196. <https://doi.org/10.1530/ERC-11-0141>
- DUARTE, Y., MÁRQUEZ-MIRANDA, V., MIOSSSEC, M. J., & GONZÁLEZ-NILO, F. (2019). Integration of target discovery, drug discovery and drug delivery: A review on computational strategies. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 11(4), e1554. <https://doi.org/10.1002/wnan.1554>
- DVINGE, H., KIM, E., ABDEL-WAHAB, O., & BRADLEY, R. K. (2016). RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. *Nature Reviews. Cancer*, 16(7), 413-430. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.51>
- EISENBERG, E., & LEVANON, E. Y. (2013). Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics: TIG*, 29(10), 569-574. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.05.010>

- El cáncer en cifras | SEOM: SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ONCOLOGÍA MÉDICA.* (2023). Recuperado 21 de marzo de 2023, de <https://seom.org/publicaciones/el-cancer-en-espanyacom>
- EPSTEIN, J. I., ZELEFSKY, M. J., SJOBERG, D. D., NELSON, J. B., EGEVAD, L., MAGI-GALLUZZI, C., VICKERS, A. J., PARWANI, A. V., REUTER, V. E., FINE, S. W., EASTHAM, J. A., WIKLUND, P., HAN, M., REDDY, C. A., CIEZKI, J. P., NYBERG, T., & KLEIN, E. A. (2016). A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *European Urology*, *69*(3), 428-435. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.06.046>
- GAN, J., LIU, S., ZHANG, Y., HE, L., BAI, L., LIAO, R., ZHAO, J., GUO, M., JIANG, W., LI, J., LI, Q., MU, G., WU, Y., WANG, X., ZHANG, X., ZHOU, D., LV, H., WANG, Z., ZHANG, Y., ... HUANG, X. (2022). MicroRNA-375 is a therapeutic target for castration-resistant prostate cancer through the PTPN4/STAT3 axis. *Experimental & Molecular Medicine*, *54*(8), 1290-1305. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00837-6>
- GASHAW, I., ELLINGHAUS, P., SOMMER, A., & ASADULLAH, K. (2012). What makes a good drug target? *Drug discovery today*, *17* Suppl, S24-S30. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.12.008>
- GÓMEZ-CEBRIÁN, N. (2023). *Characterization of the metabolic profile and identification of potencial therapeutic targets in advanced prostate cancer patients*. [Tesis Doctoral en Biomedicina y Biotecnología, Universitat de València]. RODERIC-Universitat de València
- HART, T., BROWN, K. R., SIRCOULOMB, F., ROTTAPPEL, R., & MOFFAT, J. (2014). Measuring error rates in genomic perturbation screens: Gold standards for human functional genomics. *Molecular Systems Biology*, *10*(7), 733. <https://doi.org/10.15252/msb.20145216>
- HENDRIKS, R. J., DIJKSTRA, S., JANNINK, S. A., STEFFENS, M. G., VAN OORT, I. M., MULDER, P. F. A., & SCHALKEN, J. A. (2016). Comparative analysis of prostate cancer specific biomarkers PCA3 and ERG in whole urine, urinary sediments and exosomes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *54*(3), 483-492. <https://doi.org/10.1515/cclm-2015-0599>
- HIGGINS, L. H., WITHERS, H. G., GARBENS, A., LOVE, H. D., MAGNONI, L., HAYWARD, S. W., & MOYES, C. D. (2009). Hypoxia and the metabolic phenotype of prostate cancer cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1787*(12), 1433-1443. <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2009.06.003>
- HOFBAUER, L. C., BOZEC, A., RAUNER, M., JAKOB, F., PERNER, S., & PANTEL, K. (2021). Novel approaches to target the microenvironment of bone metastasis. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *18*(8), 488-505. <https://doi.org/10.1038/s41571-021-00499-9>
- HOU, W., & ZHANG, Y. (2021). Circ\_0025033 promotes the progression of ovarian cancer by activating the expression of LSM4 via targeting miR-184. *Pathology, Research and Practice*, *217*, 153275. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2020.153275>

*Bibliografía*

- JIANG, J., TANG, X., PU, Y., YANG, Y., YANG, C., YANG, F., TIAN, Y., LI, J., SUN, H., ZHAO, S., & CHEN, L. (2022). The Value of Multimodality PET/CT Imaging in Detecting Prostate Cancer Biochemical Recurrence. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 897513. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.897513>
- JOSHI, C. J., KE, W., DRANGOWSKA-WAY, A., O'ROURKE, E. J., & LEWIS, N. E. (2022). What are housekeeping genes? *PLoS Computational Biology*, 18(7), e1010295. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010295>
- KONDA, P., & VISWANATHAN, S. R. (2022). How splicing confers treatment resistance in prostate cancer. *ELife*, 11, e82070. <https://doi.org/10.7554/eLife.82070>
- LAVALÉE, M., CURDY, N., LAURENT, C., FOURNIÉ, J. J., & FRANCHINI, D. M. (2021). Cancer cell adaptability: turning ribonucleoprotein granules into targets. *Trends in cancer*, 7(10), 902–915. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2021.05.006>
- LEE, Y., & RIO, D. C. (2015). Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annual Review of Biochemistry*, 84, 291-323. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034316>
- LEMMA, S., AVNET, S., SALERNO, M., CHANO, T., & BALDINI, N. (2016). Identification and Validation of Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis of Cancer Stem Cells. *PLoS One*, 11(2), e0149481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149481>
- LI, H., JU, Y., LIU, W. W., MA, Y. Y., YE, H., & LI, N. (2023). Phase separation of purified human LSM4 protein. *Molekuliarnaia biologii*, 57(1), 124–126. <https://doi.org/10.31857/S0026898423010068>
- LI, Q., YE, L., ZHANG, X., WANG, M., LIN, C., HUANG, S., GUO, W., LAI, Y., DU, H., LI, J., SONG, L., & PENG, X. (2017). FZD8, a target of p53, promotes bone metastasis in prostate cancer by activating canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Cancer Letters*, 402, 166-176. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.05.029>
- LYU, F., LI, Y., YAN, Z., HE, Q., CHENG, L., ZHANG, P., LIU, B., LIU, C., SONG, Y., & XING, Y. (2022). Identification of ISG15 and ZFP36 as novel hypoxia- and immune-related gene signatures contributing to a new perspective for the treatment of prostate cancer by bioinformatics and experimental verification. *Journal of Translational Medicine*, 20, 202. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03398-4>
- MAKISHIMA, H., VISCONTE, V., SAKAGUCHI, H., JANKOWSKA, A. M., ABU KAR, S., JEREZ, A., PRZYCHODZEN, B., BUPATHI, M., GUINTA, K., AFABLE, M. G., SEKERES, M. A., PADGETT, R. A., TIU, R. V., & MACIEJEWSKI, J. P. (2012). Mutations in the spliceosome machinery, a novel and

- ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood*, 119(14), 3203–3210. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-399774>
- MOTTET, N., BELLMUNT, J., BOLLA, M., BRIERS, E., CUMBERBATCH, M. G., DE SANTIS, M., FOSSATI, N., GROSS, T., HENRY, A. M., JONIAU, S., LAM, T. B., MASON, M. D., MATVEEV, V. B., MOLDOVAN, P. C., VAN DEN BERGH, R. C. N., VAN DEN BROECK, T., VAN DER POEL, H. G., VAN DER KWAST, T. H., ROUVIÈRE, O., ... CORNFORD, P. (2017). EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. *European Urology*, 71(4), 618-629. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.08.003>
- NAWAS, A. F., KANCHWALA, M., THOMAS-JARDIN, S. E., DAHL, H., DAESCU, K., BAUTISTA, M., ANUNOBI, V., WONG, A., MEADE, R., MISTRY, R., GHATWAI, N., BAYERL, F., XING, C., & DELK, N. A. (2020). IL-1-conferred gene expression pattern in ER $\alpha$ + BCa and AR+ PCa cells is intrinsic to ER $\alpha$ - BCa and AR- PCa cells and promotes cell survival. *BMC Cancer*, 20, 46. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-6529-9>
- NSENGIMANA, B., KHAN, F. A., NGOWI, E. E., ZHOU, X., JIN, Y., JIA, Y., WEI, W., & JI, S. (2022). Processing body (P-body) and its mediators in cancer. *Molecular and cellular biochemistry*, 477(4), 1217–1238. <https://doi.org/10.1007/s11010-022-04359-7>
- PAANANEN, J., & FORTINO, V. (2020). An omics perspective on drug target discovery platforms. *Briefings in Bioinformatics*, 21(6), 1937-1953. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz122>
- REBELLO, R. J., OING, C., KNUDSEN, K. E., LOEB, S., JOHNSON, D. C., REITER, R. E., GILLESSEN, S., VAN DER KWAST, T., & BRISTOW, R. G. (2021). Prostate cancer. *Nature Reviews. Disease Primers*, 7(1), 9. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0>
- RIGGS, C. L., KEDERSHA, N., IVANOV, P., & ANDERSON, P. (2020). Mammalian stress granules and P bodies at a glance. *Journal of cell science*, 133(16), jcs242487. <https://doi.org/10.1242/jcs.242487>
- SADEGHI, R. N., KARAMI-TEHRANI, F., & SALAMI, S. (2015). Targeting prostate cancer cell metabolism: Impact of hexokinase and CPT-1 enzymes. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(4), 2893-2905. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2919-4>
- SAINI, S. (2016). PSA and beyond: Alternative prostate cancer biomarkers. *Cellular Oncology (Dordrecht)*, 39(2), 97-106. <https://doi.org/10.1007/s13402-016-0268-6>
- SARDANA, G., JUNG, K., STEPHAN, C., & DIAMANDIS, E. P. (2008). Proteomic analysis of conditioned media from the PC3, LNCaP, and 22Rv1 prostate cancer cell lines: Discovery and validation of candidate prostate cancer biomarkers. *Journal of Proteome Research*, 7(8), 3329-3338. <https://doi.org/10.1021/pr8003216>



*Bibliografía*

- SATHIANATHEN, N. J., PHILIPPOU, Y. A., KUNTZ, G. M., KONETY, B. R., GUPTA, S., LAMB, A. D., & DAHM, P. (2018). Taxane-based chemohormonal therapy for metastatic hormone-sensitive prostate cancer. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 10(10), CD012816. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012816.pub2>
- SEKHOACHA, M., RIET, K., MOTLOUNG, P., GUMENKU, L., ADEGOKE, A., & MASHELE, S. (2022). Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. *Molecules*, 27(17), 5730. <https://doi.org/10.3390/molecules27175730>
- SHALEM, O., SANJANA, N. E., & ZHANG, F. (2015). High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nature Reviews. Genetics*, 16(5), 299-311. <https://doi.org/10.1038/nrg3899>
- SIEGEL, R. L., MILLER, K. D., & JEMAL, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(1), 7-30. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>
- SOHLBERG EM, THOMAS IC, YANG J, KAPPAHN K, DASKIVICH TJ, SKOLARUS TA, SHELTON JB, MAKAROV DV, BERGMAN J, BANG CK, GOLDSTEIN MK, WAGNER TH, BROOKS JD, DESAI M, LEPPERT JT. (2020). Life expectancy estimates for patients diagnosed with prostate cancer in the Veterans Health Administration. *Urologic Oncology*, 38(9), 734.e1-734.e10. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2020.05.015>
- SVEEN, A., KILPINEN, S., RUUSULEHTO, A., LOTHE, R. A., & SKOTHEIM, R. I. (2016). Aberrant RNA splicing in cancer; expression changes and driver mutations of splicing factor genes. *Oncogene*, 35(19), 2413-2427. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.318>
- SWANSON, G. P., TREVATHAN, S., HAMMONDS, K. A. P., SPEIGHTS, V. O., & HERMANS, M. R. (2021). Gleason Score Evolution and the Effect on Prostate Cancer Outcomes. *American Journal of Clinical Pathology*, 155(5), 711-717. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa130>
- SZELISKI, K., ADAMOWICZ, J., GASTECKA, A., DREWA, T., & POKRYWCZYŃSKA, M. (2018). Modern urology perspectives on prostate cancer biomarkers. *Central European Journal of Urology*, 71(4), 420-426. <https://doi.org/10.5173/cej.2018.1762>
- TSHERNIAK, A., VAZQUEZ, F., MONTGOMERY, P. G., WEIR, B. A., KRYUKOV, G., COWLEY, G. S., GILL, S., HARRINGTON, W. F., PANTEL, S., KRILL-BURGER, J. M., MEYERS, R. M., ALI, L., GOODALE, A., LEE, Y., JIANG, G., HSIAO, J., GERATH, W. F. J., HOWELL, S., MERKEL, E., ... HAHN, W. C. (2017). Defining a Cancer Dependency Map. *Cell*, 170(3), 564-576.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.010>
- TU, Z., WANG, L., XU, M., ZHOU, X., CHEN, T., & SUN, F. (2006). Further understanding human disease genes by comparing with housekeeping genes and other genes. *BMC Genomics*, 7, 31. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-31>

- UNIPROT CONSORTIUM. (2023). UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D523-D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
- VAJDA, A., MARIGNOL, L., BARRETT, C., MADDEN, S. F., LYNCH, T. H., HOLLYWOOD, D., & PERRY, A. S. (2013). Gene expression analysis in prostate cancer: The importance of the endogenous control. *The Prostate*, 73(4), 382-390. <https://doi.org/10.1002/pros.22578>
- WADOSKY, K. M., & KOOCHEKPOUR, S. (2016). Molecular mechanisms underlying resistance to androgen deprivation therapy in prostate cancer. *Oncotarget*, 7(39), 64447-64470. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10901>
- WANG, G., ZHAO, D., SPRING, D. J., & DEPINHO, R. A. (2018). Genetics and biology of prostate cancer. *Genes & Development*, 32(17-18), 1105-1140. <https://doi.org/10.1101/gad.315739.118>
- WANG, S., SU, W., ZHONG, C., YANG, T., CHEN, W., CHEN, G., LIU, Z., WU, K., ZHONG, W., LI, B., MAO, X., & LU, J. (2020). An Eight-CircRNA Assessment Model for Predicting Biochemical Recurrence in Prostate Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 599494. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.599494>
- WESTABY, D., FENOR DE LA MAZA, M. DE L. D., PASCHALIS, A., JIMENEZ-VACAS, J. M., WELTI, J., DE BONO, J., & SHARP, A. (2022). A New Old Target: Androgen Receptor Signaling and Advanced Prostate Cancer. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 62, 131-153. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-052220-015912>
- WILL, C. L., & LÜHRMANN, R. (2011). Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7), a003707. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003707>
- YANG, H., BEUTLER, B., & ZHANG, D. (2022). Emerging roles of spliceosome in cancer and immunity. *Protein & Cell*, 13(8), 559-579. <https://doi.org/10.1007/s13238-021-00856-5>
- YE, J., COULOURIS, G., ZARETSKAYA, I., CUTCUTACHE, I., ROZEN, S., & MADDEN, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- YIN, J., LIN, C., JIANG, M., TANG, X., XIE, D., CHEN, J., & KE, R. (2021). CENPL, ISG20L2, LSM4, MRPL3 are four novel hub genes and may serve as diagnostic and prognostic markers in breast cancer. *Scientific Reports*, 11(1), 15610. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95068-6>
- ZHAN, X., YAN, C., ZHANG, X., LEI, J., & SHI, Y. (2018). Structures of the human pre-catalytic spliceosome and its precursor spliceosome. *Cell Research*, 28(12), 1129-1140. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0094-7>
- ZHANG, D., HU, Q., LIU, X., JI, Y., CHAO, H.-P., LIU, Y., TRACZ, A., KIRK, J., BUONAMICI, S., ZHU, P., WANG, J., LIU, S., & TANG, D. G. (2020). Intron retention is a hallmark and spliceosome

*Bibliografía*

represents a therapeutic vulnerability in aggressive prostate cancer. *Nature Communications*, 11(1), 2089. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15815-7>

ZHANG, J., & MANLEY, J. L. (2013). Misregulation of pre-mRNA alternative splicing in cancer. *Cancer Discovery*, 3(11), 1228-1237. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0253>

## 8. ANEXOS

### Anexo 1. Relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza.				X
ODS 2. Hambre cero.				X
ODS 3. Salud y bienestar.	X			
ODS 4. Educación de calidad.				X
ODS 5. Igualdad de género.				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento.				X
ODS 7. Energía asequible y no contaminante.				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico.				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras.				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.				X
ODS 12. Producción y consumo responsables.				X
ODS 13. Acción por el clima.				X
ODS 14. Vida submarina.				X
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.				X
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos.				X

Los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) son un conjunto de objetivos globales adoptados el 25 de septiembre de 2015 con la finalidad de poner fin a la pobreza, proteger el planeta y mejorar las vidas y las perspectivas de las personas en todo el mundo. Resulta, por tanto, de gran importancia hacer cumplir estos objetivos en la práctica profesional y en todos los ámbitos.

Este trabajo se encuentra fuertemente relacionado con el ODS 3. Salud y bienestar. Este ODS tiene como finalidad garantizar una vida sana y promover el bienestar. En concreto, se puede relacionar con el punto 3.4 “reducir en un tercio la mortalidad prematura por enfermedades no transmisibles”, pues el cáncer de próstata es una enfermedad no transmisible que en estados avanzados presenta una esperanza de vida de tan solo 5 años. El desarrollo de nuevas dianas terapéuticas resulta de especial relevancia para evitar este hecho.

## **Anexo 2. Protocolo seguido para la purificación del plásmido**

### Día 1.

1. Haciendo uso de un asa de siembra, se plaquearon en placas 50  $\mu$ L de *E. coli* que contiene el vector lentiviral en una placa de LB agar autoclavado.
2. Incubar las placas en un incubador estático a 37 °C durante toda la noche.

### Día 2.

1. Hacer un minicultivo a partir de una colonia de bacteria de 3 mL de LB más ampicilina. Incubar a 37 °C en un agitador hasta el final del día.
2. Al final del día, transferir 500  $\mu$ L del medio a un matraz Erlenmeyer de 1 L con 250 mL de LB más ampicilina. Incubar durante toda la noche en un agitador a 37 °C.

### Día 3.

1. Recoger el cultivo y centrifugar a 4.500 rpm durante 10 min a RT.
2. Descartar el sobrenadante, resuspender el pellet en 5 mL de Solución I (4.5 g glucosa + 1.5 g Tris + 1.86 g EDTA, hasta un volumen de 500 mL con H<sub>2</sub>O) fría y transferir a un Falcon de 50 mL.
3. Añadir 25 mg de lisozima (2.000 U/mg) e incubar a RT durante 8 min.
4. Añadir 10 mL de Solución II recién hecha (22.75 mL H<sub>2</sub>O MQ + 1.25 mL 20% SDS + 1 mL 5M NaOH), incubar en hielo durante 10 min, con agitación regular con la mano. Asegurarse de que la solución parece “melosa” y no hay hebras o solución lechosa al final de la incubación.
5. Añadir 7.5 mL de Solución III (147.21 g acetato potásico + 57.5 mL ácido acético, hasta un volumen de 500 mL con H<sub>2</sub>O) e incubar en hielo durante 10 min.
6. Centrifugar los tubos a 12.000 rpm a 4 °C durante 20 min.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, añadir 14 mL (0.6 vol) de isopropanol RT e incubar a RT durante 30 min.
8. Centrifugar a 9.000 rpm a 4 °C durante 20 min.
9. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet 10 min.
10. Resuspender en 4 mL de TE (10 mM Tris a pH 8.0 + 1 mM EDTA a pH 8.0), pipeteando o vorteoando, o dejar en un agitador de plataforma basculante durante 10 min.
11. Añadir 2 mL (0.5 vol) 8 M Acetato de amonio (4 °C) e incubar en hielo 30 min.
12. Centrifugar a 10.000 rpm a 4 °C 10 min.
13. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, añadir 12 mL (2 vol) con etanol 100% frío e incubar a -20 °C durante 1 h hasta toda la noche.

### Día 4.

1. Centrifugar a 10.000 rpm a 4 °C durante 10 min.
2. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet durante 10 min.
3. Añadir 500  $\mu$ L de TE para resuspender (sin vortear ni pipetear, mezclar por inversión y dejar en un agitador de plataforma basculante), luego transferir a un microtubo de 1.5 mL.
4. Añadir 1  $\mu$ L de RNasa 10 mg/mL e incubar a 37 °C durante 30 min.
5. Añadir 250  $\mu$ L de fenol (4 °C) + 250  $\mu$ L de cloroformo, vortear 30 segundos y centrifugar a máxima velocidad a RT durante 5 min.

6. Transferir la fase superior acuosa a un nuevo microtubo y añadir 250  $\mu$ L de cloroformo. Vortear 30 segundos y centrifugar a máxima velocidad a RT durante 5 min.
7. Repetir el paso anterior.
8. Transferir la fase superior acuosa a un nuevo microtubo.
9. Preparar un microtubo de 1.5 mL adicional con 1 mL de etanol 70% frío.
10. Añadir 50  $\mu$ L de 3 M acetado de sodio al DN, mezclar bien.
11. Realizar este paso una vez por tubo, añadir 1 mL de etanol 100% frío, mezclar por inversión. El DNA debe precipitar y parecer algodón de azúcar en el tubo, inmediatamente recuperar el DNA usando una punta de 10  $\mu$ L y transferir a un microtubo que contenga etanol al 70%.
12. Centrifugar a máxima velocidad a 4 °C durante 5 min, descartar el sobrenadante y dejar secar durante toda la noche.
13. Resuspender en TE (con un volumen dependiente del tamaño del pellet) y cuantificar el DNA resultante.

## INFORME DE ORIGINALIDAD

---

<b>1</b> %	<b>1</b> %	<b>0</b> %	%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

---

## FUENTES PRIMARIAS

---

<b>1</b>	<b>idus.us.es</b> Fuente de Internet	<b>1</b> %
<b>2</b>	<b>hdl.handle.net</b> Fuente de Internet	<b>1</b> %

---

Excluir citas      Activo  
Excluir bibliografía      Activo

Excluir coincidencias < 70 words