



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 400**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01) **G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/74** (2006.01) **C12N 9/12** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01) **C07K 14/72** (2006.01)

**C12Q 1/48** (2006.01) **A61K 38/00** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01) **A61P 13/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07013919 .1**

96 Fecha de presentación : **16.07.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2017621**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.01.2009**

54

Título: **Método de predicción de la malignidad del cáncer de próstata mediante la detección de la expresión de la quinasa relacionada con la proteína quinasa C, PRK1.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**19.10.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**19.10.2011**

73

Titular/es: **Universitätsklinikum Freiburg  
Hugstetter Strasse 49  
79106 Freiburg, DE**

72

Inventor/es: **Schüle, Roland y  
Metzger, Eric**

74

Agente: **Mir Plaja, Mireia**

ES 2 366 400 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Método de predicción de la malignidad del cáncer de próstata mediante la detección de la expresión de la quinasa relacionada con la proteína quinasa C, PRK1

5

**[0001]** La presente invención se refiere a un método de predicción de la malignidad del cáncer de próstata como se define en la reivindicación 1.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

**[0002]** Las modificaciones postranscripcionales de las histonas, tales como la metilación, la acetilación y la fosforilación, regulan la estructura de cromatina y la expresión génica<sup>1</sup>. Los residuos de treonina y serina son fosforilados por quinasas específicas que permanecen bajo el control de rutas de señalización. No se ha vinculado a la regulación transcripcional una fosforilación de la histona H3 en la treonina 11 (H3T11). Se ha descubierto que la quinasa 1 relacionada con la proteína quinasa C (PHK1)<sup>2</sup> fosforila la H3T11 tras el reclutamiento ligando-dependiente en genes diana de receptores de andrógenos (AR). La fosforilación de H3T11 es un evento inicial que precede a la desmetilación de mono-, di- y trimetil-histona H3 en la lisina 9 por JMJD2C y demetilasa 1 lisina-específica (LSD1), y la PRK1 es fundamental para la función de los AR, puesto que el silenciamiento de la PRK1 mediante inhibición del RNAi o de la PHK1 mediante tratamiento con Ro318220 impide la expresión génica AR-dependiente. El bloqueo de la función de RPK1 anula la fosforilación inducida por andrógenos de H3T11, pero también bloquea en consecuencia la desmetilación de la mono-, di- y trimetil-H3K9, así como la acetilación de la histona H3 en las lisinas 0 y 14 (H3K9 y H3K14). Además ya no se observa en los promotores diana de AR la presencia de serina 5-RNA polimerasa II fosforilada. Así, la fosforilación de H3T11 por PRK1 establece una nueva marca epigenética para la activación transcripcional, identificando la PRK1 como guardián de la expresión génica regulada por AR. Esta ruta es de la máxima importancia puesto que el silenciamiento de la PRK1 en las células de cáncer de próstata inhibe la activación transcripcional inducida por andrógenos y la proliferación de las células tumorales. Así, nuestros datos sugieren que la regulación génica específica requiere el ensamblaje y la acción coordinada de quinasas y demetilinas. Además, la regulación de la actividad PRK1 en solitario o en combinación con LSD1 y JMJD2C podría ser una prometedora estrategia terapéutica para controlar la actividad de AR en el cáncer de próstata. Y es importante el hecho de que los altos niveles de PRK1 se correlacionan positivamente con los altos puntajes de Gleason de los carcinomas de próstata, permitiendo que la presente invención sea usada en la puntuación de los carcinomas de próstata.

**[0003]** Las colas N-terminales de las histonas están sometidas a una plétora de modificaciones postranscripcionales tales como acetilación, fosforilación y metilación por específicas enzimas modificadoras de la cromatina<sup>1</sup>. Durante la expresión génica, estas modificaciones influyen la estructura de la cromatina para facilitar el ensamblaje de la maquinaria de transcripción de la RNA polimerasa II<sup>1,3</sup>. La expresión génica dependiente de los receptores de andrógenos (AR) está caracterizada por cambios epigenéticos tales como la eliminación de las marcas metilo represivas de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9)<sup>4,5</sup> y la acetilación de las lisinas 9 y 14 de la histona H3 (H3KP/K14)<sup>6</sup>. Sin embargo, se sabe poco acerca de los reguladores del lado de cabeza que gobiernan estas modificaciones epigenéticas. Puesto que la quinasa 1 relacionada con la proteína quinasa C (PRK1) controla la expresión génica AR-dependiente<sup>2</sup>, nos preguntamos si la señalización de PRK1 regula eventos epigenéticos en los genes diana de AR.

**[0004]** El artículo de Metzger et al. titulado "A novel inducible transactivation domain in the androgen receptor implications for PRK in prostate cancer", EMBO Journal, vol. 22, N° 2, 15 de enero de 2003, páginas 270-280, da a conocer una fuerte sobreexpresión de PRK1 en el carcinoma de próstata y coexpresión de receptor de andrógenos y PRK1 in vivo.

**[0005]** Era un objeto de la invención el de aportar unos medios para puntuar los cánceres de próstata, y en particular un método ejecutado fuera del cuerpo humano o animal como se define en la reivindicación 1.

**[0006]** La memoria descriptiva también da a conocer el uso de al menos un anticuerpo con especificidad para al menos una quinasa relacionada con la proteína quinasa C (PRK) para la fabricación de una composición capaz de puntuar los carcinomas de próstata.

**[0007]** La invención se refiere a un método que es puesto en ejecución fuera del cuerpo humano o animal para puntuar carcinomas de próstata en una muestra de tejido, comprendiendo dicho método un reactivo para detectar la presencia de PRK1. En una realización preferida del sistema de análisis dicho reactivo es seleccionado de entre los miembros del grupo que consta de anticuerpos contra PRK1.

**[0008]** Se describe más detalladamente la invención haciendo referencia a las Figuras adjuntas.

#### Leyendas de las Figuras

**[0009] Figura 1:** La PRK1 controla la expresión génica AR-dependiente y se asocia con la cromatina. Se cultivaron células LNCaP en presencia o en ausencia del agonista de AR R1881; el silenciamiento de PRK1 mediado por miRNA (a) o bien el inhibidor de PRK1 Ro318220 (b) reducen la expresión de los genes *PSA* y *KLK2* endógenos (a, cuadro de

la izquierda. **b**); el análisis Western blot (**a**, cuadro de la derecha) verificó el silenciamiento específico de PRK1 mediado por miRNA; las barras representan la media +SD (SD = desviación estándar) ( $n > 4$ ). La ChIP (ChIP = inmunoprecipitación de cromatina) y la Re-ChIP (Re-ChIP = inmunoprecipitación secuencial de cromatina) (**c**) usando los anticuerpos indicados demuestran la asociación andrógeno-dependiente de la PRK1 en el promotor de genes regulados por AR. La cromatina precipitada fue amplificada por PCR (PCR = reacción en cadena de la polimerasa) usando cebadores que flanquean a los AREs (AREs = elementos de respuesta a los andrógenos), la región promotora de los genes **PSA** Y **KLK2**, o los promotores de los genes **GAPDH** y **U6** no afines.

**[0010] Figura 2:** La PRK1 fosforila la histona H3 en la treonina 11 (H3T11). GST (GST = glutiona S-transferasa) y fragmentos de GST-3 expresados bacterianamente (**a**, **b**) o nucleosomas de células HeLa (**c**) fueron incubados por espacio del periodo de tiempo indicado con PRK1 activa o la PHK1 mutante sin actividad quinasa K644E en presencia o en ausencia del inhibidor Ro318220. La coloración con azul de Coomassie muestra las cantidades de proteínas de fusión con GST usadas (**a** y **b**, cuadros inferiores). Los Western blots fueron decorados con los anticuerpos indicados (**c**). Células LNCaP (**d**, **e**) fueron cultivadas en presencia o en ausencia del agonista de AR R1889, transfectadas con RNAi Stealth, y sometidas a ChIP con los anticuerpos indicados. La cromatina precipitada fue amplificada por PCR usando cebadores que flanquean a los AREs en la región promotora de los genes **PSA** y **KLK2**. El análisis Western blot (**d**, cuadro de la derecha) verificó el específico silenciamiento de PRK1 mediado por siRNA.

**[0011] Figura 3:** La PRK1 controla las modificaciones epigenéticas de la histona H3 y la expresión génica AR-dependiente. Para la ChIP (**a**, **b**, **f**, **g**) y las transfecciones transitorias (**c**, **d**, **e**), las células fueron cultivadas en presencia o en ausencia del agonista de AR R1881 y del inhibidor Ro318220 como se indica. Células LNCaP fueron transfectadas con RNAi Stealth (**a**, **f**). Los análisis de ChIP fueron llevados a cabo con los anticuerpos que se indican. La cromatina precipitada fue amplificada por PCR usando los cebadores que flanquean a los AREs en la región promotora de los genes **PSA** y **KLK2**. Para las transfecciones transitorias, células CV1 (**c**, **e**) o 293 (**d**) fueron cotransfectadas con plásmido de expresión de AR e informadores AR-dependientes. Las barras representan la media + SD ( $n > 4$ ).

**[0012] Figura 4:** Los niveles de PRK1 se correlacionan positivamente con la malignidad del cáncer de próstata y la proliferación de células tumorales de control. La correlación de la alta expresión de PRK1 con el alto puntaje de Gleason en un panel de 111 carcinomas de próstata humana es altamente significativa:  $r = 0,499$ ,  $p < 0,001$ . Se incluyen como control (**a**) muestras de próstata normal ( $n = 20$ ). En las células LNCaP, el silenciamiento de PRK1 mediado por miRNA reduce severamente la proliferación celular inducida por R1881. Las barras representan la media +SD ( $n > 4$ ) (**b**).

**[0013] Figura Suplementaria S1:** La PRK1 controla la expresión génica AR-dependiente. Células LNCaP fueron cultivadas en presencia o en ausencia del agonista de AR R1881. El silenciamiento de PRK1 mediado por miRNA (**a**) o el inhibidor Ro318220 (**b**) reducen severamente la actividad informadora AR-dependiente. Las barras representan la media + SD ( $n > 4$ ).

**[0014] Figura Suplementaria S2:** En lisados de células 293, la presencia de proteínas PRK1 usadas para el análisis de la quinasa fue verificada mediante análisis Western blot usando un anticuerpo  $\alpha$ -myc (**a**) o un anticuerpo  $\alpha$ -flag (**b**).

**[0015] Figura Suplementaria S3:** Los anticuerpos  $\alpha$ -fosfoH3T11 que se usaron para los análisis Western blot (**a**) y para los ensayos de ChIP (**b**) reconocieron específicamente al H3 fosfo T11. Con 1  $\mu$ g del péptido indicado se moteó nitrocelulosa (Protran BA 79, Schleicher & Schuell). El péptido H3 1-20 fue obtenido de la Peptides & Elephants. Los péptidos H35-13 fosfoS10 y H3 5-13 fosfoT11 fueron obtenidos de la Abcam. Los Western blots fueron decorados como se indica. Los controles presentan iguales cantidades de péptidos coloreados con rojo de Ponceau (**a**, **b**, cuadros inferiores).

**[0016] Figura Suplementaria S4:** El AR, la PRK1 K644E, la JMJD2C y la LSD1 no influyen la actividad transcripcional del informador de control TK-LUC. Células GV1 (**a**, **c**) o 293 (**b**) fueron cotransfectadas con plásmidos de expresión y el informador TK-LUC en presencia o en ausencia de R1881 y Ro318220, como se indica. Las barras representan la media + SD ( $n > 4$ ).

**[0017]** Se describe a continuación más detalladamente la invención haciendo referencia a las Figuras.

**[0018]** Mediante los procedimientos que se dan conocer en la memoria descriptiva se controla bajo condiciones de fosforilación de las histonas al menos un mecanismo regulado por andrógenos (regulado por AR) en las células de mamífero. Tales mecanismos regulados por AR son numerosos en el cuerpo de los mamíferos (el cual es el principal pero no exclusivo objetivo de la presente invención, puesto que se considera que todos los procesos que se dan conocer en la memoria descriptiva se producen ya sea *in vivo* o bien *in vitro*) y son perfectamente conocidos para un experto en el presente campo de la técnica. Las realizaciones preferidas (aunque no exclusivas) de los mecanismos regulados por AR en las células de mamífero son todas ellas procesos fisiológicos controlados por el receptor de andrógenos (AR), tales como procesos seleccionados de entre los miembros del grupo que consta de la expresión génica controlada por los receptores de andrógenos y la proliferación celular inducida por andrógenos y la función de la próstata inducida por andrógenos y la formación de músculos inducida por andrógenos y la formación de los huesos

inducida por andrógenos, y preferiblemente el control de la densidad ósea inducido por andrógenos, y la fertilidad inducida por andrógenos y el crecimiento capilar de un mamífero inducido por andrógenos.

5 **[0019]** A este respecto, el vocablo “mamífero” tiene el significado de abarcar a todos los animales (incluyendo los humanos) que nutren a la progenie mediante lactancia. La invención no queda limitada a los humanos, e incluye a otros mamíferos tales como por ejemplo el ganado bovino, los caballos, los monos, los perros, los gatos, los conejos, etc.

10 **[0020]** En el sentido en el que se la utiliza en la memoria descriptiva, la expresión “bajo condiciones de fosforilación de las histonas” significa que las células de mamífero en observación son mantenidas en un estado en el que las modificaciones de las histonas mediante reacciones de condensación en ciertos residuos con residuos con contenido de fósforo, y en particular con residuos fosfato, pueden ser realizadas bajo condiciones biológicamente aceptables o condiciones equiparables a las condiciones biológicas y opcionalmente en presencia de adecuadas enzimas catalizadoras. Preferiblemente, la fosforilación se produce en la histona H3 en la treonina 11 (H3T11).

15 **[0021]** En el sentido en el que se le utiliza en la presente descripción, el vocablo “modulación” significa todo cambio en la actividad de la enzima, ya sea en el sentido de una aceleración o bien en el sentido de una desaceleración. En realizaciones preferidas de la invención, la actividad de PRK es modulada en el sentido de una regulación a la baja, es decir, en el sentido de una desaceleración de la quinasa, la cual es una reacción en virtud de la cual, en casos específicos y preferidos, es bloqueado en la célula de mamífero el mecanismo regulado por (al menos un) receptor de andrógeno y catalizado por PRK.

20 **[0022]** En el sentido en el que se le utiliza en la presente descripción, se entiende que el vocablo “medicamento” significa agentes o composiciones farmacéuticamente eficaces (comprendiendo éstas últimas, además del agente farmacéuticamente eficaz, adicionales agentes eficaces y/o sustancias auxiliares tales como, por ejemplo, cargas, solventes, recubrimientos y otras sustancias auxiliares perfectamente conocidas) que tienen un efecto preventivo o terapéutico en al menos una parte (como p. ej. una célula o un grupo de células) del cuerpo de un mamífero, así como sustancias y composiciones que puedan ser usadas a efectos diagnósticos o a otros efectos médicamente útiles, como por ejemplo (en el caso presente) para la puntuación y evaluación de ciertas células (o de su estado de salud). Un ejemplo es la puntuación de células de carcinoma de próstata.

25 **[0023]** Con respecto a la expresión “controlando al menos un mecanismo regulado por AR en una célula de mamífero”, se hace referencia a la explicación que se ha dado anteriormente.

30 **[0024]** La memoria descriptiva también da a conocer el uso de al menos un anticuerpo con especificidad para al menos una quinasa relacionada con la proteína quinasa C (PRK) para la fabricación de una composición, como por ejemplo un método ejecutado fuera del cuerpo humano o animal y capaz de puntuar los carcinomas de próstata. Se considera que un método de este tipo es capaz de suplementar al, incrementar la fiabilidad del y, en el futuro, sustituir al sistema de puntuación de Gleason del estado de la técnica que se usa para puntuar el grado de malignidad y diferenciación tisular del cáncer de próstata.

35 **[0025]** El correspondiente método comprende como componentes mínimos al menos un anticuerpo específico de PRK, el sustrato (que habitualmente es la muestra de tejido a investigar fisiológicamente) y agentes auxiliares tales como, por ejemplo, tampones y agentes de ajuste del valor pH, siendo dichos agentes auxiliares perfectamente conocidos para un experto en la materia y estando los mismos a su disposición de acuerdo con el método a ejecutar.

40 **[0026]** Se describe a continuación más amplia y detalladamente la invención en conexión con los experimentos llevados a cabo por los inventores.

45 **[0027]** Para iniciar nuestro estudio, analizamos el efecto del silenciamiento de la PRK1 en la expresión de los genes diana de AR endógenos. Células de tumor de próstata LNCaP fueron transducidas con lentivirus que expresan miRNAs dirigidos contra la PRK1, lo cual redundó en una eficaz y específica regulación a la baja de la PRK1 endógena (Fig. 1a, cuadro de la derecha).

50 **[0028]** Los análisis cuantitativos por RT-PCR (RT-PCR = transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa) demuestran que la reducción de los niveles PRK1 menoscaba en gran medida la expresión inducida por andrógenos de genes diana de AR endógenos tales como el Antígeno Específico de la Próstata (PSA) o la calicreína 2 (KLK2) (Fig. 1a, cuadro de la izquierda). Por añadidura, el tratamiento con el inhibidor de PRK1 Ro318220 <sup>2</sup> impide severamente la expresión inducida por andrógenos de los genes diana de AR, demostrando que la actividad quinasa de la PRK1 es esencial para la función de los AR (Fig. 1b). Análogamente, el silenciamiento de la PRK1 mediado por miRNA o el tratamiento con Ro318220 redundó en una fuerte disminución de la expresión inducida por ligandos de varios informadores AR-dependientes (Fig. Suplementaria S1 a, b).

55 **[0029]** Para investigar si la PRK1 se asocia con la cromatina *in vivo*, células LNCaP fueron sometidas a inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en presencia o en ausencia del agonista de AR R1881. La PRK1 se asocia con

los elementos de respuesta a los andrógenos (AREs) situados en los promotores de los genes *PSA* y *KLK2* de manera ligando-dependiente (Fig. 1c, cuadro de la izquierda). El reclutamiento de PRK1 en la cromatina es específico puesto que no es enriquecido el DNA que corresponde a los promotores de los genes *GAPDH* y *U6* no afines.

5 **[0030]** Para demostrar que la PRK1 y el AR están presentes en el mismo complejo sobre los promotores de *PSA* y de *KLK2*, células LNCaP tratadas con R1881 fueron sometidas a inmunoprecipitación secuencial de cromatina (Re-ChIP), primeramente con un anticuerpo  $\alpha$ -AR y luego con un anticuerpo  $\alpha$ -PRK1. Es importante el hecho de que las regiones que contienen elementos de respuesta a los andrógenos son específicamente enriquecidas, lo cual demuestra que la PRK1 y el AR forman un complejo sobre cromatina de manera ligando-dependiente (Fig. 1c, cuadro de la derecha).

10 **[0031]** Para comprender cómo la asociación de la PRK1 y del AR con la cromatina redundante en una expresión génica incrementada, realizamos ensayos para comprobar si la PRK1 fosforila directamente la cola N-terminal de la histona H3. Myc-PRK1 y la PRK1 mutante sin actividad quinasa identificada con indicador K644E<sup>2</sup> fueron inmunoprecipitadas a partir de lisados de células 293 con un anticuerpo  $\alpha$ -myc o un anticuerpo  $\alpha$ -flag, respectivamente (Fig. Suplementaria S2 a, b) e incubadas con GST-H3 1-44 expresada bacteriamente y purificada o proteína de control GST. La GST-H3 1-44 es fosforilada por la PRK1, pero no por la PRK1 K644E (Fig. 2a). La proteína de control GST no es fosforilada, demostrando así especificidad. Además, la adición de Ro318220 bloquea completamente la fosforilación de GST-H3 1-44 por la PRK1 (Fig. 2a).

20 **[0032]** El mapeo de delección reveló que tan sólo el fragmento de histona H3 que abarca los residuos de aminoácidos 1 a 15 (H3 1-15), pero no los residuos H3 16-30 o H3 39-44, es fosforilado por la PRK1 recombinante purificada (Fig. 2b). Y lo que es más importante, la mutación de treonina 11 a alanina en H3 1-15 (H3 1-15 T11A) suprime la fosforilación, demostrando que la PRK1 se direcciona a la histona H3 en la treonina 11 (H3T11) (Fig. 2b). Además incubamos nucleosomas purificados de células HeLa con PRK1 recombinante en presencia o en ausencia de Ro318220. El análisis Western blot, llevado a cabo con un anticuerpo específico  $\alpha$ -fosfoH3T11 (Fig. Suplementaria S3 a) demuestra que la PRK1 fosforila los nucleosomas en H3T11 (Fig. 2c). Esta fosforilación es bloqueada por el Ro318220 (Fig. 2c).

25 **[0033]** Para determinar si la PRK1 controla la fosforilación de H3T11 en los promotores de genes regulados por AR *in vivo*, células LNCaP fueron primeramente transfectadas con un siRNA de control no afín o con un siRNA dirigido contra PRK1, en presencia o en ausencia de R1881, y fueron luego sometidas a ChIP. La adición de ligando redundante en fosforilación de H3T11 en los AREs (AREs = elementos de respuesta a los andrógenos) de los promotores de *PSA* y *KLK2* (Fig. 2d, cuadro de la izquierda). La fosforilación inducida por andrógenos en H3T11 es PRK1-dependiente puesto que es bloqueada por el silenciamiento de la PRK1. La depleción de PRK es específica y no afecta a los niveles de AR endógenos (Fig. 2d, cuadro de la derecha). Para corroborar que la fosforilación de H3T11 inducida por andrógenos es ejecutada por PRK1, células LNCaP fueron cultivadas en presencia o en ausencia de Ro318220 y sometidas a ChIP. Como era previsible, el Ro318220 bloquea eficazmente la fosforilación de H3T11 inducida por ligandos (Fig. 2e).

30 **[0034]** Tomados juntamente, estos datos demuestran que la PRK1 fosforila la H3T11. Es importante el hecho de que la fosforilación de H3T11 va asociada a la expresión génica AR-dependiente, introduciendo así la H3T11 fosforilada como nueva marca epigenética para la activación transcripcional.

35 **[0035]** Puesto que la expresión ligando-dependiente de genes diana de AR exige la eliminación de las marcas metilo represivas de la H3K9<sup>4,5</sup> y la acetilación de la histona H3K9/K14<sup>6</sup>, analizamos si la PRK1 controla cambios en estas marcas epigenéticas. Por consiguiente, células LNCaP cultivadas en presencia o en ausencia de R1881 fueron transfectadas con un siRNA de control no afín o bien con un siRNA dirigido contra la PRK1 y sometidas a ChIP. La desmetilación ligando-inducida de tri-, di- y monometil H3K9 en los AREs de los promotores de *PSA* y *KLK2* es severamente menoscabada por el silenciamiento de la PRK1 (Fig. 3a). Además es también bloqueada la acetilación ligando-inducida de H3K9/K14 (Fig. 3a). Análogamente, la inhibición de la actividad de PRK1 por el Ro318220 redundante en una pérdida de desmetilación de H3K9 y acetilación de H3K9/K14 (Fig. 3b), poniendo en evidencia que la actividad quinasa de PRK1 es fundamental para controlar estas alteraciones epigenéticas en los genes diana de AR.

40 **[0036]** Como se ha demostrado anteriormente, la JMJD2C<sup>4</sup> y la LSD1<sup>5</sup> eliminan las marcas metilo represivas de la H3K9 durante la transcripción AR-dependiente. Puesto que la PRK1 controla la desmetilación de la H3K9, investigamos el efecto recíproco entre la PRK1 y las demetilinas durante la expresión génica en las transfecciones transitorias. La coexpresión de AR con JMJD2C (Fig. 3c y ref. <sup>4</sup>) o bien con LSD1 (Fig. 3d y ref. <sup>5</sup>) redundante en una fuerte activación ligando-dependiente de los informadores PSA-LUC o MMTV-LUC. La coactivación por parte de las demetilinas es anulada por la PRK1 K644E, que actúa como un mutante negativo dominante, o bien por el tratamiento con Ro318220. Para examinar el efecto de la PRK1 K644E en la estimulación cooperativa de la actividad de AR por parte de la JMJD2C y de la LSD1, expresamos ambas demetilinas en cantidades limitadas que en solitario no activan los AR, pero juntamente inducen una fuerte superactivación de los AR<sup>4</sup>. Como se muestra en la Figura 3e, la PRK1 K644E bloquea la estimulación cooperativa de la actividad de AR. El TK-LUC informador de control no se ve afectado por la PRK1 (Fig. Suplementaria S4 a-c). Colectivamente, estos datos demuestran que la señalización de PRK1 controla la activación transcripcional de los AR por parte de las demetilinas JMJD2C y LSD1.

**[0037]** La iniciación de la transcripción requiere una transición de la preiniciación al complejo de iniciación que está caracterizada por la fosforilación de la RNA polimerasa II en la serina 5 en el dominio de repetición C-terminal (S5-P CTD pol II) por parte del componente CDK7 del TFIIH<sup>3</sup>. Para determinar si la depleción o inhibición de la PRK1 interfería en la formación del complejo de iniciación transcripcional en los promotores regulados por AR, llevamos a cabo ChIP usando un anticuerpo que reconoce específicamente a la S5-P CTD pol II. Es importante el hecho de que el silenciamiento de la PRK1 o el tratamiento de células con Ro318220 redundaba en la pérdida de S5-P CTD pol II en los promotores de *PSA* y *KLK2*. En contraste con ello, no se ve afectado el reclutamiento de RNA polimerasa II, como se demuestra mediante ChIP usando un anticuerpo dirigido contra el dominio N-terminal de la RNA polimerasa II ( $\alpha$ -NTD pol II) (Fig. 3 f, g).

**[0038]** Tomados juntamente, estos datos demuestran que la PRK1 no tan sólo controla cambios en marcas epigenéticas en la histona H3, sino que también regula la transición de la preiniciación al complejo de iniciación.

**[0039]** Para aclarar la importancia fisiológica de la PRK1, investigamos los niveles de PRK1 *in vivo* inmunocoloreando un panel de 20 próstatas humanas normales y 111 carcinomas de próstata en matrices ("microarrays") de tejido. La cuantificación de la inmunoreactividad puntuando la intensidad de coloración y el porcentaje de células de carcinoma positivas<sup>7</sup> revela que la alta expresión de PRK1 se correlaciona significativamente con los altos puntajes de Gleason e indica la biología agresiva de los tumores (Fig. 4a).

**[0040]** Además, para examinar si la PRK1 regula la proliferación de células tumorales, procedimos a supervisar el crecimiento celular dependiente de andrógenos cuantificando la proliferación de células LNCaP infectadas con pLenti6-miRNA-PRK1. Al establecer la comparación con células que expresan un miRNA de control no afín, se ve que la proliferación de células LNCaP inducida por andrógenos se ve espectacularmente reducida por el silenciamiento de la PRK1 (Fig. 4b), subrayando así la importancia de la PRK1 en el control del crecimiento AR-dependiente de las células tumorales.

**[0041]** En resumen, demostramos que la H3T11 fosforilada es una nueva marca epigenética para la regulación transcripcional. La fosforilación de la H3T11 es ejecutada por la PRK1 de manera andrógeno-dependiente. Controlando los subsiguientes pasos de activación génica tales como la desmetilación de la tri-, di- y monometil H3K9, la acetilación de la H3K9/K14 y la presencia de S5-P CTD pol II en los promotores diana, la PRK1 funciona como guardián de la expresión génica regulada por AR. Es de importancia nuestra observación de que inhibidores tales como el Ro318220 controlan la actividad quinasa de la PRK1 y con ello regulan los AR. Así, la modulación específica de la actividad de PRK1 es una prometedora estrategia terapéutica en el tratamiento del cáncer de próstata, donde el AR es fundamental para el control de la proliferación de las células tumorales.

## Ejemplos

### Plásmidos

**[0042]** Se han descrito anteriormente los plásmidos siguientes: pSG5-AR, pCMX-flag, pCMV-flag-PRK1 K644E, pcDNA3-myc- $\Delta$ NPRK1, TK-LUC, MMTV-LUC, Probasin-LUC y PSA-LUC<sup>2</sup>; pCMX-flag-JMJD2C<sup>4</sup>, pCMX-flag-LSD1<sup>5</sup>, GST-H3 1-44<sup>8</sup>.

**[0043]** Para construir los constructos pLenti6-miRNA1-PRK1, pLenti6-miRNA2-PRK1, pGW-miRNA1-PRK1 y pGW-miRNA2-PRK1, el DNA que corresponde a miRNA1-PRK1 (5'-TGCTGATTGCTGTAGGTCTGGATCATGTTTTGGCCACTG ACTGACATGATCCACCTACAAT-3' (Protocolo de Secuencia: 1) y 5'-CCTGATTGCTGTAGGTGGATCATGTCAGTCAGTGGCCAAAACATGA TCCAGACCTACAGCAATC-3') (Protocolo de Secuencia: 2) y miRNA2-PRK1 (5'-TGCTGTTACTGTCTGCAACATCTGCGTTTTGGCCA CTGACTGACGCAGATGTCAGGACAGTAA-3' (Protocolo de Secuencia: 3) y (5'-CCTGTTACTGTCTGACATCTGCGTCAGTCAGTGGCCAAAACGCA GATGTTGCAGGACAGTAAAC-3') (Protocolo de Secuencia: 4) fue clonado en pLenti6/V5-DEST y pcDNA-6,2-GW-EmGFP según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Para construir GST-H3 1-15, GST-H3 1-15 T11A, GST-H3 16-30 y GST-H3 29-44, los correspondientes fragmentos de cDNA fueron clonados en pGEX4T1. A petición pueden facilitarse los detalles de la clonación.

### Cultivo y transfección celular

**[0044]** Células CV1 y LNCaP fueron cultivadas y transfectadas como se ha descrito<sup>2</sup>. Fueron transfectadas las cantidades siguientes por pocillo: 500 ng de MMTV-LUC, Probasin-LUC o PSA-LUC; 25 ng de plásmido de expresión de AR; 200 ng (Fig. 3e) o 400 ng (Fig. 3c, d) de los plásmidos de expresión de LSD1 o JMJD2C; 150 ng de PRK1 K644E y 1000 ng del plásmido de expresión de miRNA-control, miRNA1-PRK1 o miRNA2-PRK1 (Fig. Suplementaria S1 a). Las células fueron cultivadas por espacio de 18 horas en presencia o en ausencia de R1881  $1 \times 10^{-10}$  M (Sigma) y Ro318220  $2,5 \times 10^{-6}$  M (Fig. 3d) o  $4,5 \times 10^{-6}$  M (Fig. 3c) (Roche) como se ha indicado. La actividad de luciferasa fue analizada como se ha descrito<sup>2</sup>. Todos los experimentos fueron repetidos al menos cuatro veces por duplicado.

## Generación del anticuerpo para la PRK1

[0045] El anticuerpo policlonal para la  $\alpha$ -PRK1 de conejo fue generado según procedimientos estándar.

## 5 Inmunoprecipitación de cromatina

[0046] Fueron llevados a cabo experimentos de CHIP y Re-CHIP como se ha descrito <sup>5,9</sup>. Células LNCaP fueron cultivadas por espacio de 45 min. (Fig. 1c, 2d, 2e) o por espacio de 210 min. (Fig. 3a, b, f, g) en presencia o en ausencia de R1881  $1 \times 10^{-8}$ M como se ha indicado. 60 min. antes de la adición de R1881 fue añadido a las células LNCaP (Fig. 3b, g) Ro318220 ( $1 \times 10^{-5}$ M). Tres días antes de la recolección, las células LNCaP fueron transfectadas con RNAi Stealth (ctr: 5'-GAACAUGAUCCAGACCUACAGCAAU-3' (Protocolo de Secuencia: 5); PRK1:5'-GAAAGUCCUAGAUCACACGCAAU-3' (Protocolo de Secuencia: 6); Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La inmunoprecipitación fue llevada a cabo con anticuerpos específicos ( $\alpha$ -monoMeH3K9,  $\alpha$ -diMeH3K),  $\alpha$ -triMeH3K9,  $\alpha$ -acetil-H3K9/K14,  $\alpha$ -H3,  $\alpha$ -AR (Upstate Biotechnology),  $\alpha$ -S5-P CTD pol II,  $\alpha$ - fosfoH3T11 (Abcam),  $\alpha$ -NTD pol II (N-20, Santa Cruz),  $\alpha$ -LSD1 <sup>5</sup>,  $\alpha$ -JMJD2C <sup>4</sup> y  $\alpha$ -PRK1) en proteína A-Sepharose 4B (GE-Healthcare). Para la PCR se usaron 1-5  $\mu$ l de 50  $\mu$ l de extracto de DNA. Han sido anteriormente descritos <sup>5</sup> cebadores de PCR para ARE | + | (PSA -459/-121), ARE III (PSA -4288/-3922), *KLK2* (-343/-90), *GAPDH* y *U6*.

## 20 Análisis Western blot

[0047] Los experimentos fueron llevados a cabo como está descrito <sup>2</sup>. Los Western blots fueron decorados como se ha indicado.

## 25 Ensayo de proliferación celular

[0048] Los experimentos fueron llevados a cabo como se ha descrito <sup>5</sup>. Se usaron pLenti6-miRNA-PRK1, pLenti6-miRNA1-PRK1 y pLenti6-miRNA2-PRK1 para producir lentivirus recombinantes para infectar las células LNCaP como se ha descrito <sup>10</sup>. Las células infectadas fueron cultivadas por espacio de 72 horas en un medio que contenía un 10% de FCS de doble tira.  $1 \times 10^4$  células fueron cultivadas en una placa de cultivo de 96 pocillos en presencia o en ausencia de R1881  $1 \times 10^{-8}$ M. El Ensayo Colorimétrico Elisa BrdU de proliferación celular (Roche) fue llevado a cabo según las instrucciones del fabricante. La figura muestra la comparación de los incrementos porcentuales de la proliferación en presencia y en ausencia de R1881. Los experimentos fueron llevados a cabo por quintuplicado.

## 35 RT-PCR cuantitativa y análisis estadístico

[0049] La RT-PCR cuantitativa y el análisis estadístico fueron llevados a cabo como se ha descrito <sup>5</sup>. Han sido anteriormente descritos <sup>5</sup> los cebadores para *GAPDH*, *PSA* y *KLK2*.

## 40 Ensayo de la quinasa *in vitro*

[0050] Los ensayos de la quinasa fueron llevados a cabo como se ha descrito <sup>11</sup>. 10  $\mu$ g de proteínas H3 marcadas con GST o 1  $\mu$ g de nucleosomas purificados a partir de células HeLa <sup>12</sup> fueron incubados con proteínas PRK1 inmunoprecipitadas (Fig. 2a) o 1  $\mu$ g de PRK1 recombinante purificada (Fig. 2b, c; Propinase GmbH) por espacio de un periodo de tiempo de 0 a 10 min. (Fig. 2c) o de 20 min. (Fig. 2a, b) a 30°C en tampón de quinasa que contenía tris-HCl 20mM pH 7.5, ATP 20 $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> 8mM y 5 $\mu$ Ci de ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P) ATP. La mezcla de reacción fue analizada por SDS-PAGE (SDS-PAGE = electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico) seguida por autorradiografía o análisis Western blot usando los anticuerpos indicados.

## 50 Análisis estadístico de las matrices de tejido

[0051] Se han descrito anteriormente <sup>7</sup> los datos clínicos de los clientes y los procedimientos para generar las matrices de tejido. El análisis estadístico fue llevado a cabo con la Prueba U de Mann-Whitney usando el programa SPSS 12.0 (SPSS Inc.) y calculando el coeficiente de correlación de Spearman Rank de dos colas. Los números de casos (n) analizados por cada puntaje de Gleason (Gs) fueron los siguientes: Gs 3 (n = 5); Gs 4 (n = 12); Gs 5 (n = 11); GS 6 (n = 25); Gs 7 (n = 16); Gs 8 (n = 23), Gs 9 (n = 10); Gs 10 (n = 9). Muestra de próstata normal (n = 20).

## Literatura

### 60 [0052]

1. Strahl, B. D. & Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-5, (2000).
2. Metzger, E. et al. A novel inducible transactivation domain in the androgen receptor: implications for PRK in prostate cancer. *EMBO J.* 22, 270-80-. (2003).
3. Phatnani, H. P. & Greenleaf, A. L. Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev.* 20, 2922-36, (2006).

4. Wissmann, M. et al. Cooperative demethylation by JMJD2C and LSD1 promotes androgen receptor-dependent gene expresión. *Nat. Cell. Biol.* 9, 347-53, (2007).
5. Metzger, E. et al. LSD1 demethylates repressive histone marks to pro-mote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* 437, 436-9, (2005).
6. Kang, Z., Pirskanen, A., Janne, O. A. & Palvimo, J. J. Involvement of proteasome in the dynamic assembly of the androgen receptor transcription complex. *J. Biol. Chem.* 277, 48366-71, (2002).
7. Kahl, P. et al. Androgen receptor coactivators lisyne-specific histone demethylase 1 and four and a half LIM domain protein 2 predict risk of prostate cancer recurrence. *Cancer Res.* 66, 11341-7, (2006).
8. Dai, J., Sultan, S., Taylor, S. S & Higgins, J. M. The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev.* 19, 472-88, (2005).
9. Shang, Y., Myers, M. & Brown, M. Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol. Cell* 9, 601-10, (2002).
10. Wiznerowicz, M. & Trono, D. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J. Virol.* 77, 8957-61, (2003).
11. Dong, L. Q. et al. Phosphorylation of protein kinase N by phosphoinositide-dependent protein kinase-1 mediates insulin signals to the actin cytoskeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5089-94, (2000).
12. O'Neill, T.E., Roberge, M. & Bradbury, E. M. Nucleosome arrays inhibit both initiation and elongation of transcripts by bacteriophage T7 RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 223, 67-68, (1992).

**Entidad Solicitante**

[0053] Calle: Hugstetterstr. 49 Ciudad: Friburgo País: Alemania Código Postal: 79106 Número de Teléfono: Número de Fax: Dirección de E-mail:

<110> Nombre de la Entidad: Universitätsklinikum Freiburg

**Proyecto de la Solicitud**

<120> Título: Fosforilación de la Histona H3 en la Treonina 11 - Una Nueva Marca Epigenética para la Regulación Transcripcional

<130> Referencia Expediente Solicitud: P 2186 EP

<140> Número de Solicitud Actual: 000000000

<141> Fecha de Presentación Actual: 16-07-2007

**Secuencia**

<213> Nombre del Organismo: Artificial

<400> Cadena de la Presecuencia:

**tgctgattgc tgtaggctctg gatcatgttt tggccactga ctgacatgat ccacctaca** 60  
**t** 61

<212> Tipo: DNA

<211> Longitud: 61 Nombre de la Secuencia: 1 Descripción de la Secuencia:

**Secuencia**

<213> Nombre del Organismo: Artificial <400> Cadena de la Presecuencia:

**cctgattgct gtaggtggat catgtcagtc agtggccaaa acatgatcca gacctacagc** 60  
**aatc** 64

<212> Tipo: DNA

<211> Longitud: 64 Nombre de la Secuencia: 2 Descripción de la Secuencia:

**Secuencia**

<213> Nombre del Organismo: Artificial <400> Cadena de la Presecuencia:

**tgctgttact gtctctgcaac atctgcgttt tggccactga ctgacatgaga tctcaggaca** 60  
**ataa** 64

<212> Tipo: DNA <211> Longitud: 64 Nombre de la Secuencia: 3 Descripción de la Secuencia:

**Secuencia**

<213> Nombre del Organismo: Artificial <400> Cadena de la Presecuencia:

**cttgttactg tcttgacatc tgcptcagtc agtggccaaa atgcaggatgt tgcaggacag** 60  
**taac** 64

<212> Tipo: DNA

<211> Longitud: 64 Nombre de la Secuencia: 4 Descripción de la Secuencia:

**Secuencia**

<213> Nombre del Organismo: Artificial

<400> Cadena de la Presecuencia:

gaacaugauc cagaccuaca gcaau 25

<212> Tipo: RNA

<211> Longitud: 25

Nombre de la Secuencia: 5

Descripción de la Secuencia:

**Secuencia**

<213> Nombre del Organismo: Artificial

<400> Cadena de la Presecuencia:  
gaaaguccua gauccacacg caaau 25  
<212> Tipo: RNA  
<211> Longitud: 25

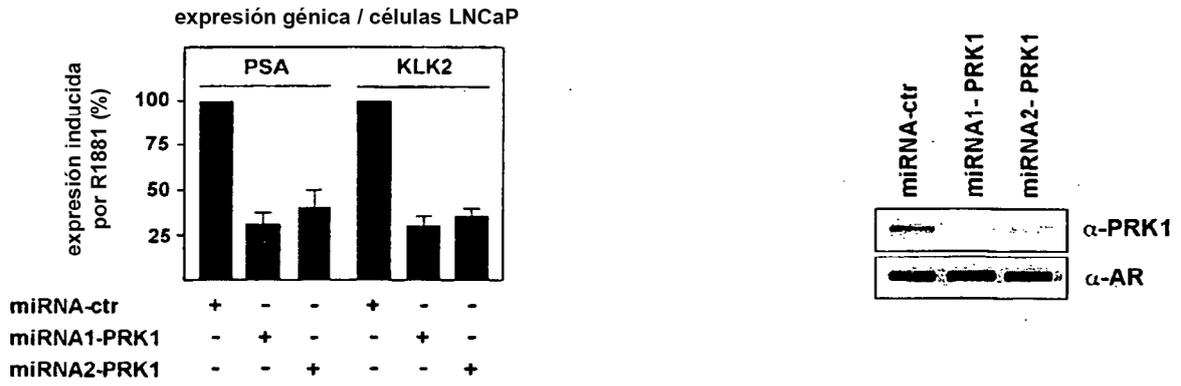
5 Nombre de la Secuencia: 6 Descripción de la Secuencia:

**REIVINDICACIONES**

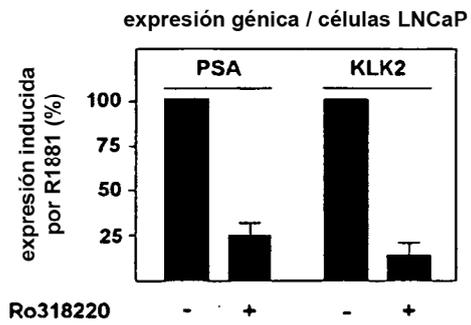
1. Método que es para predecir la malignidad del cáncer de próstata, es ejecutado fuera del cuerpo humano o animal y comprende al menos los pasos de:
- 5 (a) analizar una muestra de células de próstata obtenidas;
- (b) detectar el nivel de quinasa relacionada con la proteína quinasa C, PRK1, en dicha muestra usando un anticuerpo específico para la PRK1;
- (c) comparar dicho nivel de PRK1 con el nivel de PRK1 en una muestra de próstata normal;
- 10 (d) predecir la malignidad de dicho cáncer de próstata sobre la base de dicha comparación, en donde la cantidad del nivel de PRK1 en dicha muestra se correlaciona con la biología agresiva de dicho cáncer de próstata, es decir que cuanto más alto es el nivel de PRK1, tanto más agresivo es el cáncer de próstata.

Schuele\_Figura 1

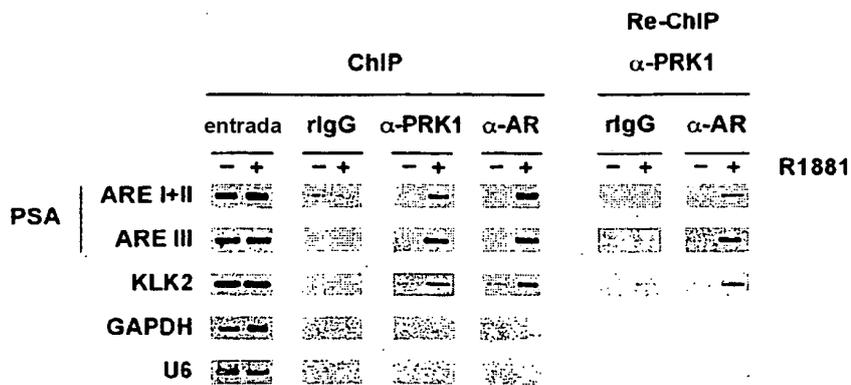
a



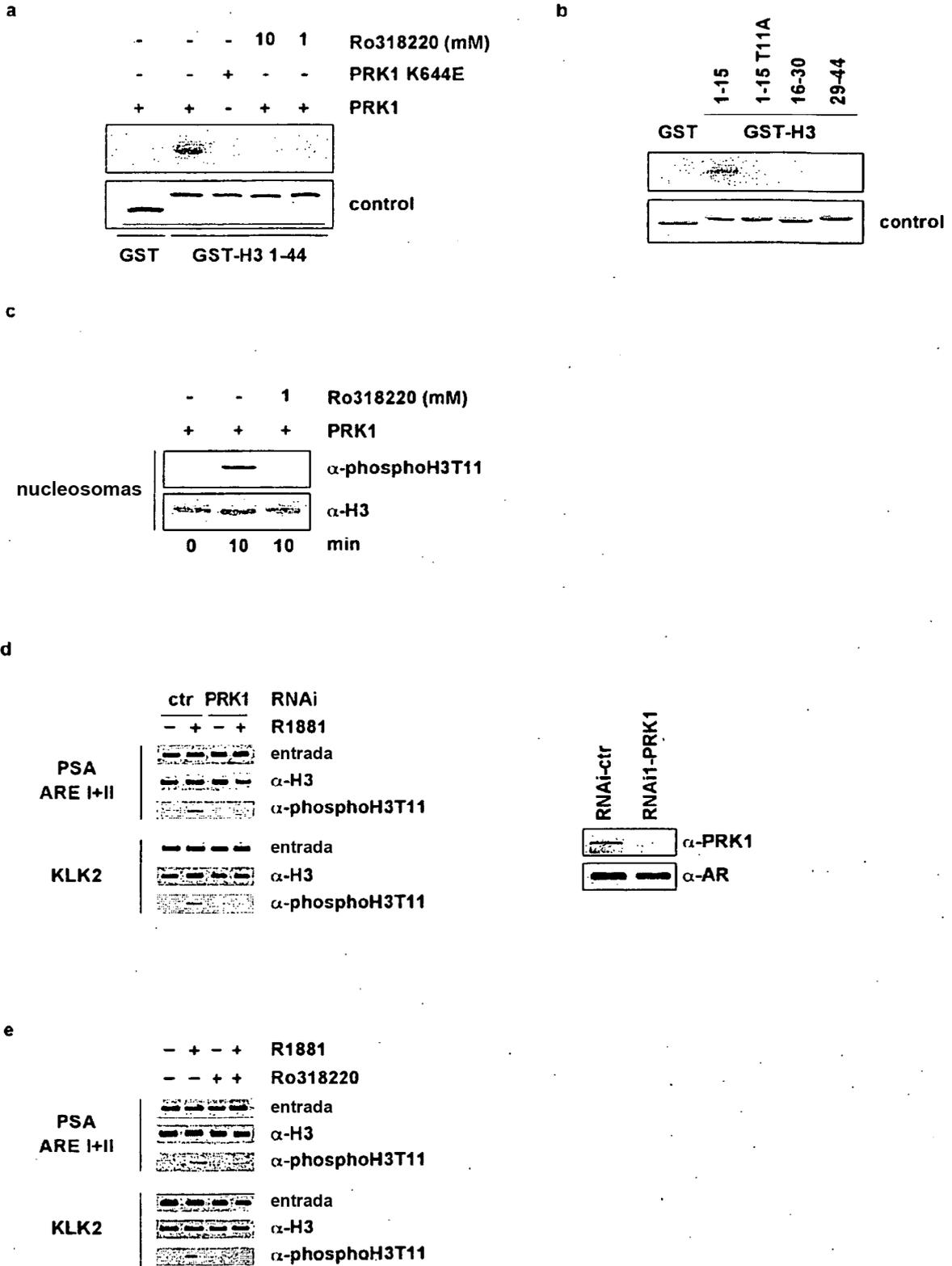
b



c

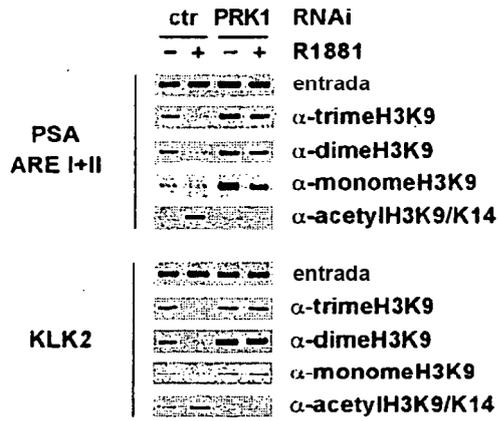


Schuele\_Figura 2

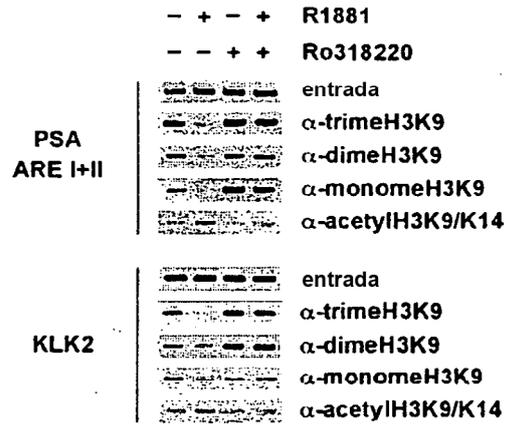


Schuele\_Figura 3

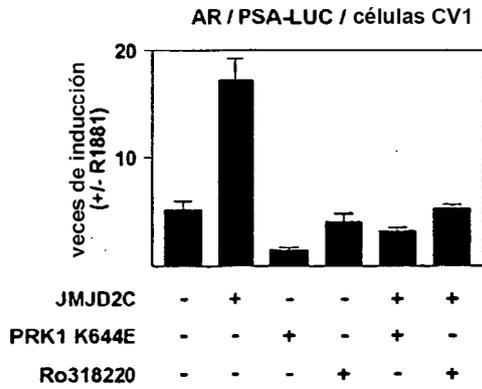
a



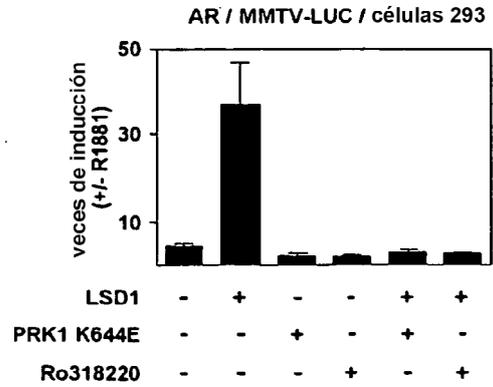
b



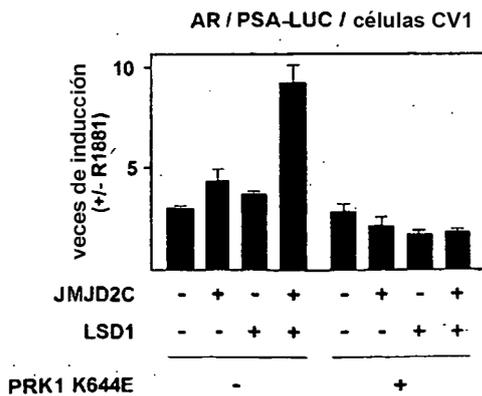
c



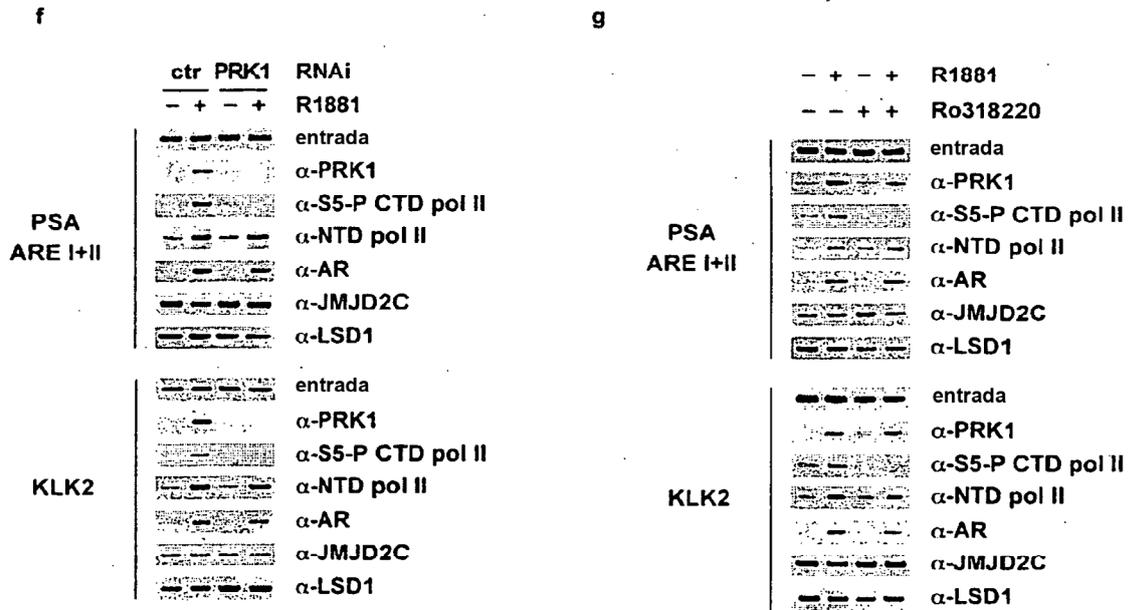
d



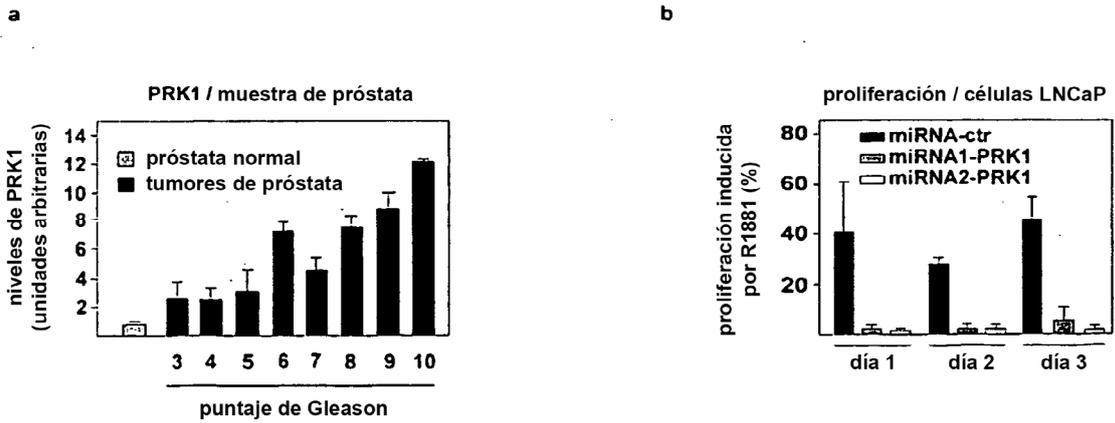
e



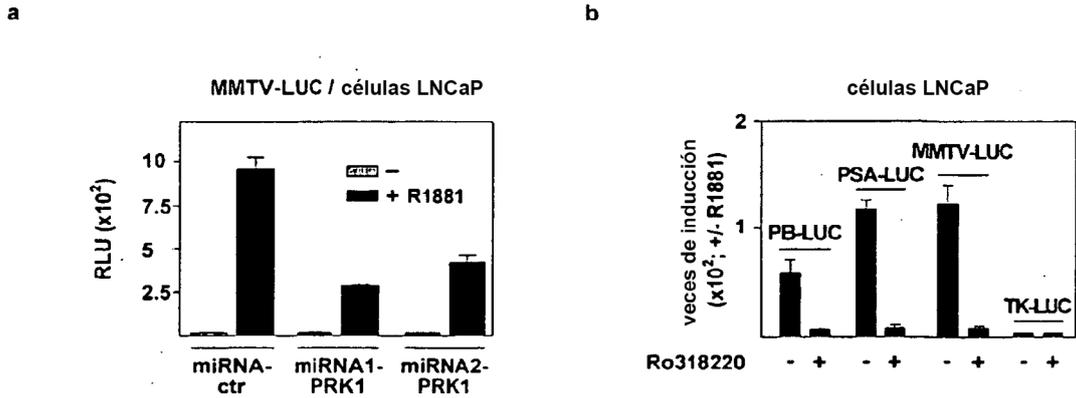
Schuele\_Figura 3



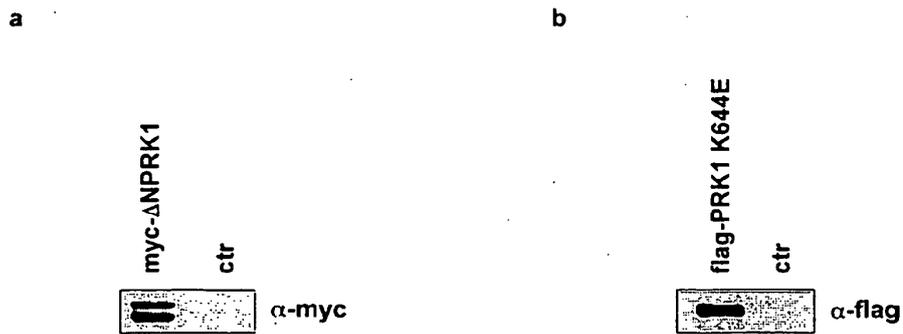
Schuele\_Figura 4



Schuele\_Figura Suplementaria S1

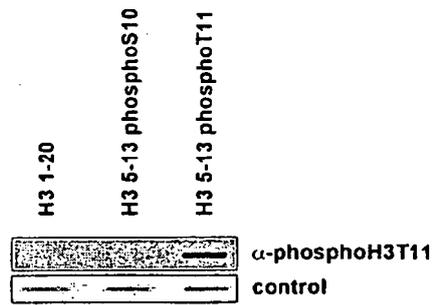


Schuele\_Figura Suplementaria S2

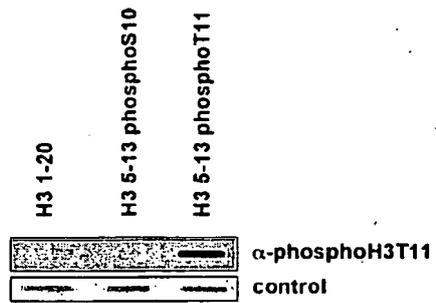


Schuele\_Figura Suplementaria S3

a

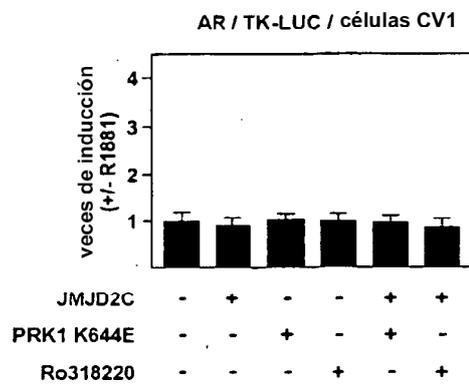


b

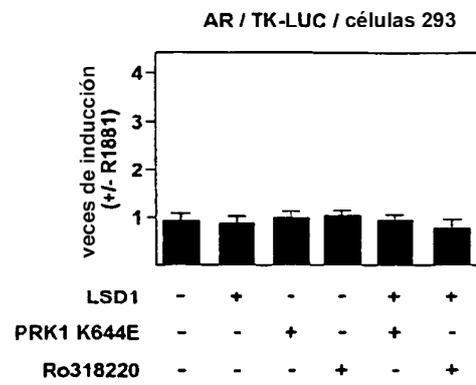


Schuele\_Figura Suplementaria S4

a



b



c

