

Sobreexpresión de PTP1B induce mayor proliferación celular en cultivos primarios de cáncer de mama

PTP1B overexpression induces greater cell proliferation in primary cultures of breast cancer

Osvaldo Hernández-Flores, José Esparza-López, Elizabeth Escobar-Arriaga, Eucario León-Rodríguez, María de Jesús Ibarra-Sánchez.

▷ RESUMEN

Introducción: Diversos estudios han demostrado que la proteína fosfatasa de tirosina (PTP1B), juega un papel clave en la regulación de diversas vías de señalización celular. Estudios recientes han demostrado que PTP1B participa en la vía de HER2, en la iniciación de la tumorigénesis en cáncer de mama. Reportes previos han demostrado una regulación positiva de la PTP1B sobre la expresión de HER2. No obstante, se desconocen los efectos que esto implica sobre el desarrollo tumoral.

Objetivo: Evaluar el papel de la expresión de PTP1B en procesos biológicos, como la proliferación de células de cáncer de mama.

Material y métodos: Se realizaron ensayos de proliferación en cultivos celulares, en los cuales se sobreexpresó PTP1B mediante transfección de plásmidos.

Resultados: La sobreexpresión de PTP1B confiere una mayor capacidad proliferativa a las células tumorales, con un incremento del 80% en la tasa de proliferación.

Conclusión: La sobreexpresión de PTP1B se asocia a un incremento en la proliferación celular. Esto abre la

▷ ABSTRACT

Introduction: Several studies have shown that the protein tyrosine phosphatase (PTP1B) plays a key role in several signaling pathways. Recent studies have shown that PTP1B participates in the initiation of tumorigenesis mediated by Her2 in breast cancer. Previous reports demonstrated the upregulation of the expression of PTP1B on Her2, yet unknown effects that this implies on tumor development.

Objective: To assess the role of PTP1B expression in biological processes such as proliferation in cell cultures of breast cancer.

Material and methods: Cell proliferation assays were performed in cell cultures, which are overexpressed in PTP1B by transfection of plasmids.

Results: Overexpression of PTP1B confers greater proliferative capacity in tumor cells with a 80% increase in the proliferation rate.

Conclusion: Overexpression of PTP1B is associated with increased cell proliferation. This opens the possibility to investigate new prognostic markers in breast cancer and development of new molecular targets, such as the use of PTP1B inhibitors as therapy aimed at reducing the proliferation and metastatic potential of tumor cells.

posibilidad a la investigación de nuevos marcadores pronósticos en cáncer de mama y al desarrollo de nuevos blancos moleculares, ya que se puede considerar el uso de inhibidores de PTP1B como terapia dirigida a disminuir la proliferación y el potencial metastásico de las células tumorales.

Palabras clave: Proteína PTP1B, proteína HER-2, proliferación celular, cáncer de mama, México.

Keywords: PTP1B protein, HER-2 protein, cell proliferation, breast cancer, Mexico.

► INTRODUCCIÓN

La fosforilación de proteínas en residuos de tirosina es una de las modificaciones postraduccionales más importantes, que las células utilizan para regular respuestas celulares. La regulación de este proceso es crucial para varios efectos biológicos que incluyen la proliferación, diferenciación, migración y muerte celular. Además, representa un punto de control para la integración de señales extracelulares y su conversión en respuestas celulares. Los niveles de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina se encuentran estrechamente controlados, por una acción coordinada de dos tipos de enzimas llamadas proteínas tirosinas cinasas (PTK, del inglés *protein tyrosine kinase*) y las proteínas fosfatasa de tirosina (PTP, del inglés *protein tyrosine phosphatase*).¹ Las PTK's se encargan de añadir un grupo fosfato sobre residuos de tirosina de proteínas sustrato, causando un cambio estructural y promoviendo las interacciones entre proteínas en las cascadas de señalización celular. La acción de las PTK's es regulada por la acción de las PTP's, las cuales se encargan de remover un grupo fosfato de un residuo de tirosina de una proteína sustrato. La alteración del balance normal entre la actividad de las PTK's y PTP's, resulta en una fosforilación aberrante de residuos de tirosina, la cual ha sido ligada a la etiología de varias enfermedades, incluyendo el cáncer.²⁻⁵

Las PTP's constituyen una gran familia estructuralmente diversa, altamente regulada y que puede tener efectos estimulatorios o inhibitorios.⁶ En el genoma humano se han identificado un total de 107 PTP's, las cuales están divididas en receptores y no receptores.⁷ El dominio catalítico de las PTP's contiene aproximadamente 280 aminoácidos y presentan un residuo de cisteína conservado, que es requerido para la actividad catalítica. La defosforilación de los sustratos ocurre a través de un mecanismo de dos pasos, que consiste en la formación de un intermediario que se forma a través de un

enlace covalente de fosfato-PTP, que subsecuentemente se hidroliza.⁶

La función principal de las PTP's es revertir la acción de fosforilación de las PTK's. Además, las PTP's pueden potenciar acciones de las PTK's, este modo de sinergia aumenta las señales mitogénicas conduciendo a transformación y proliferación celular.¹⁻⁶

La PTP1B (PTPN1) y TC-PTP (PTPN2) fueron las primeras PTP's del tipo no receptor identificadas.⁸ La PTP1B fue purificada de la placenta humana, tiene un peso de 50kD, contiene un dominio catalítico de 37kD hacia su extremo N-terminal (residuos 1-300), seguido de una región reguladora de cerca de 80 a 100 residuos, y un dominio de localización en la membrana (residuos 400-435), que ancla la enzima a la cara citoplasmática del retículo endoplásmico.^{9,10} Su actividad catalítica es estrechamente controlada por su localización en la superficie del retículo endoplásmico, que puede restringir su acceso a los sustratos. Además, existen otros cuatro mecanismos que operan en tándem para regular la actividad de PTP1B, que son la oxidación, la fosforilación, sumoilación y proteólisis.¹¹

Diversos estudios han demostrado que PTP1B juega un papel clave en la señalización de vías metabólicas, y es un blanco terapéutico prometedor para la diabetes mellitus y la obesidad, ya que esta proteína participa en la regulación negativa en la señalización de los receptores de la insulina y la leptina. La delección del gen de *PTPN1* en ratones causa hipersensibilidad a la insulina, y está asociada con un incremento marcado de la fosforilación de tirosina del receptor de insulina y sus blancos.¹²⁻¹⁴ La PTP1B también puede inhibir la señalización de otros RTK's, tales como los receptores de PDGF y HGF,¹⁵⁻¹⁸ mientras que la sobreexpresión de PTP1B en fibroblastos inhibe la transformación por oncogenes, que incrementan la fosforilación de tirosinas incluyendo HER2, Src,

Bcr-Acl, Crk y Ras.¹⁹⁻²¹ También es requerida para la activación de las GTPasas de Rac y Ras. Además, también puede activar a Src mediante defosforilación de la tirosina 527 (Y527), localizado hacia el extremo carboxilo terminal de la cinasa.²²⁻²⁴

La PTP1B se encuentra localizada dentro de un mapa genético en el cromosoma 20 en la región q13.1-q13.2.^{25,26} Se ha demostrado que la ganancia o amplificación de la región del cromosoma 20q13, está asociada a pobre pronóstico en cáncer de mama.²⁷ No obstante, no hay datos que evalúen la sobreexpresión de PTP1B en neoplasias malignas, como factor condicionante de pobre pronóstico. Esto es contrario a lo que inicialmente se pensó, que tenían propiedades antioncogénicas a través de la regulación negativa de la actividad oncogénica de las PTK's. Sin embargo, datos recientes han demostrado que estas fosfatasa se encuentran involucradas en la regulación positiva de vías de señalización en cáncer. La PTP1B es un regulador positivo de la señalización Ras, lo cual fue demostrado en fibroblastos deficientes de PTP1B.²⁸ Estudios recientes han demostrado que PTP1B participa en la vía de HER2, en la iniciación de la tumorigénesis en cáncer de mama. La inhibición de la expresión de PTP1B fue asociada con la disminución de la fosforilación de Erk, sugiriendo que participa en esta vía de señalización en la tumorigénesis de tumores mamarios.^{28,29}

Recientemente, se ha asociado a PTP1B en la progresión y metástasis de líneas celulares de cáncer de mama y modelos murinos.^{29,30} En estudios realizados en nuestro laboratorio se ha demostrado que PTP1B, modula de forma positiva la expresión de HER2 en células tumorales de glándula mamaria,³¹ aunque el mecanismo que ejerce PTP1B sobre HER2 aún no está bien establecido.

El objetivo de este estudio es determinar el efecto de la expresión de PTP1B, sobre procesos biológicos como la proliferación celular en cultivos de cáncer de mama. Consideramos que la expresión de PTP1B probablemente puede conferir a las células tumorales, una mayor agresividad en base a la modulación de la proliferación. De ser así, PTP1B tendría una importante utilidad pronóstica y terapéutica para el desarrollo de blancos moleculares.

► MATERIAL Y MÉTODOS

CULTIVO DE CELULAS DE CÁNCER DE GLÁNDULA MAMARIA

Los cultivos celulares MBCDF y MBCD25 fueron generados previamente en el laboratorio a partir de explantes derivados de una biopsia, obtenida a partir de una

mastectomía radical (Protocolo aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", referencia 159).

PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados fueron pcDNA4A (vector vacío, sin PTP1B), pcDNA4 myc-PTP1B WT (vector con PTP1B). La purificación por *Maxiprep* con el kit QIA-GEN® se realizó de acuerdo al protocolo indicado por el fabricante. Se realizó la determinación o cuantificación de la cantidad de DNA por medio del *nanodrop*.

TRANSFECCIONES

Se transfectaron las células MBCDF, MBCD25 mediante el protocolo de lipofectamina *plus reagent*. Se colocó 1µg de plásmido (pcDNA4A y pcDNA4-myc PTP1B WT).

ENSAYO DE WESTERN BLOT

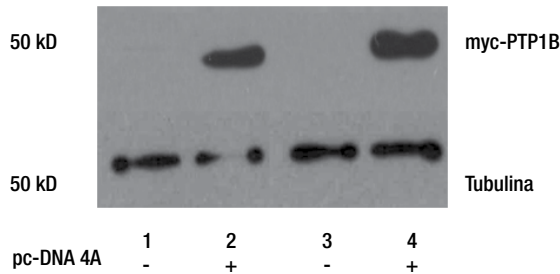
Las células se lisaron en buffer de lisis que contiene 50mM HEPES (pH 7.4), 1 mM EDTA, 250mM NaCl, 1% de Nonidato P-40, 10mM NaF, 1mM vanadato de sodio y 1X mezcla de inhibidores de proteasa (Complete, EDTA free, Roche). Treinta microgramos de proteína fueron sometidos a una electroforesis en un gel de poliacrilamida desnaturalizante, y se transfirió a una membrana inmobilon-P PVDF® (Millipore Corp Bedford, MA). La membrana se bloqueó una hora con leche 5% en PBS Tween. Posteriormente, se incubó con los anticuerpos primarios anti-myc toda la noche a 4°C. Se incubó con el anticuerpo secundario de ratón por 45 minutos. La señal fue visualizada por quimioluminiscencia, y se expuso a una película radiográfica (Kodak®).

PROLIFERACIÓN CELULAR

Se realizaron ensayos de proliferación celular, para lo cual se sembraron 5 000 células/cm² en placas de 24 en medio RPMI – 1640 suplementado con 10% de SFB. Tras la siembra celular, éstas se cultivaron durante cinco días en estufa a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%. Las células se fijaron con glutaraldehído al 1.1% en PBS, durante 20 minutos los días 0, 1, 3 y 5. Al completarse los cinco días, se procedió a la tinción de las placas con cristal violeta durante 20 minutos, posterior a lo cual se realizaron lavados con agua de las placas para retirar el exceso de colorante. Una vez completado, se dejaron solubilizar las células en 400 µl de ácido acético al 10% durante 20 minutos. Por último, la absorbancia de la solución se midió mediante espectrofotómetro a 595 nm en un lector de microplaca (Biorad 680 Microplate Reader®). Los

Figura 1.

Western Blot de la transfección transitoria y expresión de PTP1B WT, en cultivos primarios de cáncer de mama (MBCD25 y MBCDF). Los carriles 2 y 4 demuestran la actividad de myc-PTP1B, posterior a la transfección del plásmido pc-DNA4A. Los carriles 1 y 3 corresponden a los controles transfectados con el vector vacío.



resultados se expresaron como el incremento del número de células a partir del día cero.

► RESULTADOS

SOBREEXPRESIÓN DE PTP1B EN LÍNEAS CELULARES Y CULTIVOS PRIMARIOS DE CÁNCER DE MAMA

Para evaluar la participación de PTP1B en procesos biológicos como la proliferación celular, se realizó la transfección de plásmido pc-DNA4 vacío (EV) y el que contiene el cDNA de myc-PTP1B en su forma silvestre (WT), en cultivos primarios de cáncer de mama (MBCDF y MBCD25). La sobreexpresión de PTP1B fue evaluada mediante *Western Blot* usando un anticuerpo anti-myc, lo que demuestra que PTP1B está sobreexpresado en estas células (**Figura 1**). Los resultados muestran que los carriles transfectados con el vector vacío (carriles 1 y 3) no hay expresión de myc-PTP1B, mientras que en los carriles donde se expresó PTP1B (carriles 2 y 4), se encontró la expresión de myc-PTP1B.

EFFECTO DE LA EXPRESIÓN DE PTP1B SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de PTP1B sobre la proliferación, las células MBCD25 EV, MBCD25 WT, MBCDF EV y MBCDF WT transfectadas de manera estable, fueron usadas en ensayos de proliferación a cinco días. Observamos un incremento significativo en la proliferación en las líneas celulares que expresan PTP1B WT, el cual fue evidente al día tres y cinco de incubación. Estos resultados indican que la expresión de PTP1B posee un efecto proliferativo sobre las células tumorales de cáncer de mama, lo cual demuestra que esta fosfatasa ejerce acciones estimuladoras a nivel de la proliferación

celular (**Figura 2**), lo que representa un hallazgo descrito por primera vez en este trabajo. De manera notable, los efectos proliferativos más sobresalientes se observaron en la línea celular MBCD25 que sobreexpresa PTP1B (WT), con una diferencia del 80% de incremento comparada con la línea transfectada con el vector vacío (EV).

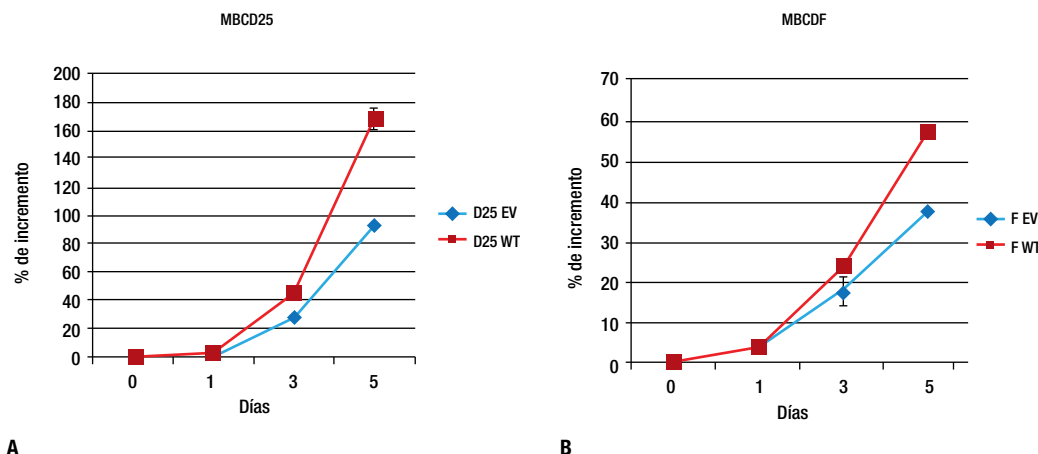
► DISCUSIÓN

La expresión de PTP1B ha sido asociada en la oncogénesis en diversas neoplasias (por ejemplo, cáncer esofágico, mama, ovario y colon). Sin embargo, el mecanismo biológico por el cual PTP1B facilita la progresión del cáncer de mama, no se ha esclarecido por completo. Estudios previos en modelos murinos han demostrado que la ausencia de expresión de PTP1B en los tumores mamarios (NDL2/PTP1B $-/-$), confiere un retraso en el desarrollo tumoral y una frecuencia menor de metástasis pulmonares.^{29,30} En humanos, no existen estudios que evalúen el papel de PTP1B como factor pronóstico, los datos existentes se dirigen a la amplificación de la región del cromosoma 20q13, donde está situado el gen de *PTP1B*, y se ha encontrado que la amplificación de esta región se asocia a un pobre pronóstico en cáncer de mama.²⁷ Otros estudios han demostrado que PTP1B activa a c-Src y la vía de Ras, defosforilando la tirosina inhibidora (Y527), lo que sugiere un papel oncogénico.²²⁻²⁴

En este estudio se demostró que la sobreexpresión de PTP1B en cultivos primarios de cáncer de mama, se asocia a un incremento significativo de la proliferación celular. Se puede plantear que el aumento en la capacidad proliferativa de las células con sobreexpresión de PTP1B ubicando a esta fosfatasa como un componente de la maquinaria de señalización que favorece la expresión, y por ende, un aumento en la actividad del receptor HER2, favoreciendo así una señalización prolongada río abajo de HER2, lo que favorecería un aumento en la capacidad proliferativa de las células. Otros estudios sugieren que el fenotipo proliferativo de *HER2/neu* está mediado por c-jun, y la ruptura de la adherencia celular mediada por STAT3.^{32,33} Estos datos nos indican que PTP1B confiere al menos, en modelos *in vitro*, un factor de mal pronóstico en cáncer, ya que su expresión se asocia a una mayor tasa de proliferación probablemente mediada por la sobreexpresión de HER2. Esto último, además, nos sugiere que la expresión de PTP1B puede favorecer el desarrollo de metástasis al conferir a las células tumorales una mayor capacidad de migración. Estos datos coinciden con los resultados encontrados en modelos murinos, donde la ausencia de PTP1B se asocia a un periodo libre de desarrollo tumoral mayor, y a una menor incidencia de metástasis pulmonares. Estos hallazgos justifican el

Figura 2.

Curvas de proliferación celular. **A)** MBCD25 WT con un porcentaje de incremento al día cinco del 170%, comparado con el 90% de la línea con el vector vacío (EV). **B)** MBCDF WT con una diferencia en el porcentaje de incremento más discreta en comparación con el vector vacío, 58% vs. 38%, respectivamente.



estudio de PTP1B como factor pronóstico, en cáncer de mama en humanos.

► CONCLUSIONES

Recientemente, en nuestro laboratorio demostramos que PTP1B regula positivamente la expresión de HER2 en cultivos celulares de cáncer de mama, con un efecto dosis- respuesta, lo que sugiere que PTP1B es un modulador de la expresión del receptor HER2.³¹ Sin embargo, se desconocen los factores que favorecen la sobreexpresión de este receptor. Tratando de definir cuál es el papel biológico de PTP1B en cáncer de mama, en este trabajo sobreexpresamos PTP1B en cultivos primarios de glándula mamaria. Confirmamos uno de los efectos ya descritos anteriormente en el laboratorio, donde la sobreexpresión de PTP1B confiere un aumento en la expresión de HER2. Para evaluar el impacto en el desarrollo tumoral, valoramos el efecto de PTP1B sobre la proliferación celular. Los resultados muestran que la sobreexpresión de PTP1B confiere una mayor capacidad proliferativa a las células tumorales, con una diferencia de hasta el 80% en la tasa de incremento.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

FINANCIAMIENTO

Protocolo apoyado por el Conacyt 102825.

REFERENCIAS

- Jiang ZX, Zhang ZY. Targeting PTPs with small inhibitors in cancer treatment. *Cancer Metastases Reviews* 2008;27(2):263-272.
- Hunter T. The Phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1998;353:583-605.
- Zhang ZY. Protein tyrosine Phosphatases: prospects for therapeutics. *Current Opinion Chemical Biology* 2001;5(4):416-423.
- Arena S, Benvenuti S, Bardelli A. Genetic analysis of the kinome and phosphatome in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2005;62:2092-2099.
- Ventura JJ, Nebreda AR. Protein kinases and phosphatases as therapeutic targets in cancer. *Clinical and Translational Oncology* 2006;8:153-160.
- Östman A, Hellberg C, Bohmer FD. Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nature Reviews* 2006;6:307-320.
- Andersen JN, Mortensen OH, Peters GH, et al. Structural and evolutionary relationships among protein tyrosine phosphatase domains. *Molecular and Cellular Biology* 2001;21:7117-7136.
- Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006;7:833-846.
- Tonks NK, Diltz CD, Fischer EH. Purification of the major protein tyrosine phosphatases of human placenta. *The Journal of Biological Chemistry* 1988;263:6722-6730.
- Frangioni JV, Beahm PH, Shifrin V, et al. The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its amino acid C-terminal sequence. *Cell* 1992;68(3):545-560.
- Woodford TT, Rhodes JD, Dixon JE. Expression of a protein tyrosine phosphatase in normal and v-src-transformed mouse 3T3 fibroblasts. *The Journal of Cell Biology* 1992;117(2):401-414.
- Bourdeau A, Dube N, Tremblay ML. Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP. *Current Opinion in Cell Biology* 2005;17:203-209.
- Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, et al. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. *Science* 1999;283:1544-1548.
- Klaman LD, Boss O, Peroni OD, et al. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B deficient mice. *Molecular and Cellular Biology* 2000;20:5479-5489.
- Liu F, Chernoff J. PTP1B associates with and is tyrosine phosphorylated by epidermal growth factor receptor in cultured cells. *Biochemical Journal* 1997;327:139-145.
- Haj FG, Markova B, Klaman LD, et al. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatase-1B. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:739-744.
- Lammers R, Bossenmaier B, Cool DE, et al. Differential activities of protein tyrosine phosphatases in intact cells. *The Journal of Biological Chemistry* 1993;268:22456-22462.

18. Kakazu A, Sharma G, Bazan HE. Association of protein tyrosine phosphatases (PTPs)-1B with c-Met receptor and modulation of corneal epithelial wound healing. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2008;49:2927-2935.
19. Brown-Shimer S, Johnson KA, Hill DE, et al. Effect of protein tyrosine phosphatase 1B expression on transformation by the human neu oncogene. *Cancer Research* 1992;52:478-482.
20. LaMontagne KRJ, Hannon G, Tonks NK. Protein tyrosine phosphatase PTP1B suppresses p210 bcr-abl induced transformation of rat-1 fibroblasts and promotes differentiation of K562 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(24):14094-14099.
21. Liu F, Sells MA, Chernoff J. Suppression of oncogene-mediated transformation of rat 3Y1 fibroblasts by protein tyrosine phosphatase 1B requires a functional SH3-ligand. *Molecular and Cellular Biology* 1998;18:250-259.
22. Bjorge JD, Pang A, Fujita DJ. Identification of protein tyrosine phosphatase 1B as the major tyrosine phosphatase activity capable of dephosphorylating and activating c-Src in several human breast cancer cell lines. *The Journal of Biological Chemistry* 2000;275:41439-41446.
23. Anderie I, Schulz I, Schmid A. Direct interaction between ER membrane-bound PTP1B and its plasma membrane-anchored targets. *Cell Signal* 2007;19(3):582-592.
24. Liang F, Lee SY, Liang J, et al. The role of protein-tyrosine phosphatase 1B in integrin signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 2005;280:24857-24863.
25. Brown SS, Johnson KA, Lawrence JB, et al. Molecular cloning and chromosome mapping of the human gene encoding protein phosphotyrosyl phosphatase 1B. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1990;87:5148-5152.
26. Forsell PA, Boie Y, Montalibet J, et al. Genomic characterization of the human and mouse protein tyrosine phosphatase-1B genes. *Gene* 2000;260:145-153.
27. Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, et al. Independent amplification and frequent co-amplification of three nonsynthetic regions on the long arm of chromosome 20 in human breast cancer. *Cancer Research* 1996;56(15):3441-3445.
28. Arias RL, Saha S, Villamar CO, et al. Activation of Src by protein tyrosine phosphatase 1B is required for ErbB2 transformation of human breast epithelial cells. *Cancer Research* 2009;69(11):4582-4588.
29. Julien SG, Dubé N, Read M, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B deficiency or inhibition delays ErbB2-induced mammary tumorigenesis and protects from lung metastasis. *Nature Genetics* 2007;39(3):338-346.
30. Bentes AM, Neel BG. Protein-tyrosine phosphatase 1B is required for HER2/Neu-induced breast cancer. *Cancer Research* 2007;67(6):2420-2424.
31. Consultado el 21 de enero de 2013. <http://132.248.9.195/ptd2012/enero/0675891/Index.html>
32. Karunakaran D, Tzahar E, Beerli RR, et al. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *The EMBO Journal* 1996;15(2):254-264.
33. Yuan G, Qian L, Shi M, et al. HER2-dependent MMP-7 expression is mediated by activated STAT3. *Cellular Signalling* 2008;20(7):1284-1291.