

29.Salud Humana

Validación de PIN1 como blanco molecular para el tratamiento de glioblastoma mediante estrategias basadas en CRISPR-Cas9

Autor: Maggio, Julián; Julian.maggiounq@gmail.com

Co-autor(es):; Gómez, Daniel Eduardo; Daniel.e.gomez700@gmail.com; Cardama, Georgina; gcardama@gmail.com; Gómez Mengual, Diego; dmengualgomez@gmail.com

Orientador: Gomez, Daniel Eduardo; Daniel.e.gomez700@gmail.com

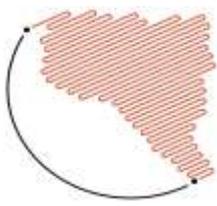
Laboratorio de Oncología Molecular

Universidad Nacional de Quilmes

Resumen

Pin1 es la única enzima descrita con la capacidad de reconocer y catalizar la isomerización de prolinas de motivos Ser/Thr-pro fosforilados, brindándole la capacidad de regular múltiples funciones celulares. Se ha observado en diversos tipos de cáncer, entre ellos glioblastoma, la sobreexpresión de pin1, vinculado a la participación de esta enzima en diversas vías oncogénicas. El glioblastoma se caracteriza por ser una enfermedad compleja y letal con recursos terapéuticos limitados. De esta necesidad de desarrollar nuevas terapias, surge el interés de explorar el rol de Pin1 en esta indicación. Sin embargo, pocos estudios se han realizado sobre la contribución de esta proteína en glioblastoma. Por estos motivos, en este trabajo nos propusimos desarrollar un modelo celular de glioblastoma pin1 *KnockOut* utilizando tecnología CRISPR/Cas9 con el objetivo de validar a Pin1 como blanco molecular en glioblastoma. Este modelo fue generado con éxito y resulta una herramienta importante tanto para el estudio de esta enfermedad como para el estudio de Pin1. Se estudió el comportamiento del modelo en diversos procesos celulares donde observamos que las células pin1 *KnockOut* disminuyeron de forma significativa su capacidad migratoria, como también su actividad telomerasa. Por otro lado, estas células mostraron un aumento en el tiempo de duplicación como una menor respuesta al estímulo proliferativo y consecuentemente un mayor arresto de las células en fase G0-G1 del ciclo celular. Todos estos resultados confirman la contribución de Pin1 en diversos procesos celulares vinculados a la tumorigénesis, validando esta proteína como un blanco molecular atractivo para el desarrollo de terapias novedosas para el tratamiento de glioblastoma.

Palabras clave: Pin1, Glioblastoma, CRISPR/Cas9



Introducción

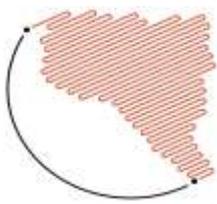
Los gliomas son los tumores más comunes del sistema nervioso central. La organización mundial de la salud los clasifica en 4 grados según el nivel de agresividad y malignidad, siendo los de grado IV tumores malignos con alta actividad mitótica, vascularización y necrosis (Huttner, 2012). Dentro de esta última categoría se clasifican a los glioblastomas multiformes (GBM) (Louis et al., 2007). Los GBM se consideran unos de los tumores más letales en humanos. Presentan una esperanza de vida promedio de tan solo 1 año después de su diagnóstico con una tasa media de supervivencia de 3 a 9 meses para los pacientes con GBM recurrente (Vredenburgh et al., 2007).

A pesar de los esfuerzos terapéuticos actuales y los avances en el diseño de los protocolos de quimioterapia y cirugía los GBM permanecen prácticamente incurables. Incluso con el tratamiento establecido que incluye cirugía, radioterapia y quimioterapia no se logra mejorar la esperanza de vida (Anjum et al., 2017).

El principal desafío frente a los GBM es su heterogeneidad causada por la alta inestabilidad genética característica de este tipo de tumor. Esto genera poblaciones resistentes a los tratamientos

actuales, motivo por el cual surge la necesidad de elaborar nuevas estrategias terapéuticas. Uno de los mecanismos de señalización más importantes involucrados en resistencia a terapias en tumores sólidos es la fosforilación aberrante de residuos de serina (Ser) y treonina (Thr) en determinadas proteínas señalizadoras (Nasser & Mehdipour). Estos motivos susceptibles de ser fosforilados se denominan Ser/Thr-Pro, debido a que esta fosforilación está dirigida por el residuo de prolina. La conformación (*cis* o *trans*) de dicha prolina es otro de los puntos de señalización celular y dichos cambios de conformación están catalizados por una única isomerasa: Pin1 (Lu & Zhou, 2007).

Pin1 es una proteína pequeña de 18 kDa que cuenta con dos dominios funcionales: un dominio N-terminal WW, con el cual es capaz de unirse específicamente a los dominios pSer/Thr-Pro y un dominio peptidilprolilisomerasa C terminal, el cual es capaz de catalizar la isomerización *cis-trans* de la prolina. Es interesante destacar, que esta proteína se encuentra cristalizada y se conocen los residuos responsables tanto de la interacción de Pin1 con los motivos pSer/Thr-Pro de diversas proteínas, así como el mecanismo de acción de su subunidad catalítica (Ranganathan, Lu, Hunter, & Noel, 1997).



Pin1 está finamente regulada en contextos fisiológicos y puede funcionar como un temporizador molecular al actuar en múltiples blancos y así dirigir sinérgicamente un cierto evento celular a una dirección en particular. Por ejemplo, en respuesta a la estimulación de la proliferación, Pin1 se activa transcripcionalmente y regula positivamente diversas vías de señalización que promueven la división celular (Lee et al., 2009; Min, Zhou, & Lu, 2016) y afectando múltiples vías de señalización oncogénicas. Por ejemplo se ha demostrado que Pin1 regula proteínas claves involucradas en varias respuestas a *stress* celular afectando particularmente la vía de MAPK mediante la fosforilación de C-jun y adicionalmente inactivando mecanismos de *feedback* negativos propios de la vía (Lu & Zhou, 2007). En este sentido, Pin1 tiene la capacidad de modular una gran variedad de procesos celulares, tales como ciclo celular, migración, proliferación, apoptosis y supervivencia.

En la patología oncológica, Pin1 está comúnmente sobreexpresada o hiperactivada. Los niveles altos de expresión o actividad correlacionan con un mal pronóstico en pacientes. Por el contrario, polimorfismos en el gen de pin1 que reducen su expresión, se asocian con una disminución del riesgo a contraer múltiples tipos de cáncer. Es interesante

agregar, que modelos animales *k.o* para Pin1 son altamente resistentes a la tumorigénesis incluso cuando se sobreexpresan oncogenes tales como HER2 y HRAS o se inactivan supresores tumorales como TP53. Se ha demostrado que Pin1 es capaz de activar más de 40 oncogenes e inactivar más de 20 genes supresores de tumor (Min et al., 2016).

Adicionalmente, Pin1 también actúa como un regulador de la longitud telomérica. Se ha demostrado que Pin1 afecta la dinámica del telomero por un lado desfavoreciendo la unión de la proteína TRF1 al telomero (Lee et al., 2009) y consecuentemente favoreciendo su elongación. Y por otro lado mediante la regulación de la activación de la vía de NF κ B que a su vez regula la expresión de Tert, la principal subunidad catalítica de la telomerasa (Ghaffari et al., 2012).

La telomerasa es una enzima con actividad polimerasa que mantiene la longitud de los telómeros mediante el agregado de secuencias nucleotídicas repetitivas. Esta enzima se encuentra normalmente en gametas y *stem cells* pero está ausente en células somáticas normales. En células normales la longitud telomérica está altamente regulada y controlada por mecanismos de homeostasis que involucran a la telomerasa y varios reguladores negativos de la longitud telomérica (Smogorzewska et al., 2000).

En un 85% de los tumores humanos la actividad telomerasa es la responsable del potencial replicativo ilimitado característico de las células tumorales a causa de la elongación telomérica (Smogorzewska et al., 2000).

Estudios realizados con células de glioblastoma con Pin1 atenuado, revelaron que la falta de esta proteína genera la inducción de la apoptosis, disminución de la proliferación celular y de la migración. De esta forma Pin1 se convierte en un potencial blanco molecular para el tratamiento de GBM (Atabay, Yildiz, Avsar, Karabay, & Kilic, 2015).

A modo de resumen, mucha información respalda la importancia de Pin1 en el desarrollo del cáncer. Tanto por su aporte en la regulación de diversas vías de señalización y por su capacidad de modular la estabilidad telomérica. Ambos procesos han sido identificados en GBM (Naderlinger & Holzmann, 2017; Nasser & Mehdipour, 2017). Sin embargo, son muy escasos los estudios de la inhibición de Pin1 en modelos de este tipo tumoral.

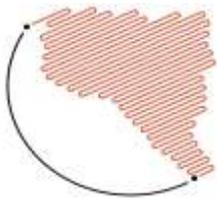
Por estos motivos el presente trabajo consistió en el desarrollo de un nuevo modelo celular de glioblastoma Pin1 *K.O.* (*knockOut*) partiendo de la línea celular LN-229 y su posterior evaluación en diferentes procesos celulares vinculados a la progresión tumoral.

Objetivo

Validar Pin1 como blanco molecular en glioblastoma multiforme

Objetivos específicos

1. Generar una línea celular *K.O* para pin1
2. Validar la línea celular pin1 *K.O* generada
3. Evaluar el comportamiento *in vitro* de la línea Pin1 *K.O* generada



Materiales y métodos

Líneas celulares y condiciones de cultivo

Para este trabajo se utilizó la línea celular de glioblastoma humano LN-229 obtenida de ATCC®. Las mismas fueron mantenidas en cultivos en monocapa con el medio de cultivo D-MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado previamente por calor, 2 mM glutamina y 80 mg/ml gentamicina.

Elaboración del plásmido CRISPR-pin1

Se llevó a cabo el diseño de oligonucleótidos con la función de sgRNA específicos para el gen pin1. Una vez desarrollados los mismos y partiendo del plásmido comercial *pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0* se siguió el protocolo indicado por el proveedor: 1) Digestión del plásmido 2) Purificación del plásmido digerido 3) Fosforilación del par de oligonucleótidos 4) Ligado de los sgRNA. La correcta ligación se confirmó observando el patrón digestión de una digestión doble en una electroforesis en gel de agarosa 0,8%. Para conservación y amplificación de la construcción realizada, se transformaron bacterias TOP10 electrocompetentes con el plásmido mediante electroporación.

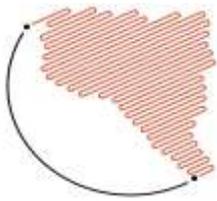
Desarrollo de línea celular K.O. para pin1 por metodología CRISPR

Una vez finalizada la construcción del plásmido con la secuencia específica para pin1 se realizó la transfección del mismo utilizando el reactivo *TransIntro™*. La transfección se realizó en células LN-229 previamente sembradas en una placa de 6 wells llevadas a una confluencia del 50%. 48hs posterior a la transfección se inició el proceso de selección de células transfectadas con el plásmido mediante el agregado de puromicina 2 μ M/ml al medio. Al día 5 del tratamiento no se apreciaron células vivas en el grupo control. Se cortó el tratamiento para permitir la replicación de las células que contenían el plásmido entre ellas las potenciales mutantes.

Validación de las líneas LN-229 pin1 K.O.

1. Western blot

Partiendo de aproximadamente 1×10^6 células tanto de LN-229 *wt* como las potenciales LN-229 pin1 *K.O.* (*Knock-out*) se realizaron lisados proteicos utilizando buffer RIPA con Inhibidor de Proteasas (*Sigma*). Los lisados fueron sembrados en un gel de poliacrilamida al 10%, para su posterior corrida por electroforesis y se realizó la transferencia las proteínas a una membrana de PDVF. Esta membrana fue



bloqueada utilizando una suspensión de leche en polvo en TBS-T 0,1%. La membrana fue incubada *over night* con el anticuerpo primario anti-Pin1 (sc-46660) a una dilución 1/500 y adicionalmente se marcó tubulina como control de carga proteica. Luego de una serie de lavados se reveló el ensayo utilizando un anticuerpo secundario *anti mouse* conjugado con HRP (*Biorad*) con un *kit* de bioluminiscencia (*BioLumina, PBL*) el revelado fue captado utilizando el equipo *C-digit (Li-Cor)*.

2. Citometría de flujo

Se resuspendieron células LN-229 *wt* y LN Pin1 *K.O.* por tripsinización. Se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en PBS. Las mismas fueron fijadas utilizando paraformaldehído 4% en PBS con 1% de SFB durante 15 minutos a 4°C. Luego se permeabilizaron las células utilizando una solución de PBS-TWEEN 0,1% con 1% de SFB durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se colectaron las células y las mismas se resuspendieron en 50ul de PBS con el anticuerpo anti Pin1 1/50 (sc-46660) y se incubaron por 30 minutos. Luego de 3 lavados se incubaron las mismas con el anticuerpo secundario () y luego de lavados fueron resuspendidas finalmente en 200 de PBS y analizaron en el equipo *FACSCalibur (BD)*.

Caracterización de la línea LN Pin1 *K.O.*

1. Migración

Las células fueron cultivadas en D-MEM con 10% SFB hasta una confluencia del 60/70%. Una vez alcanzada esta confluencia las mismas se lavaron con PBS y se agregó medio fresco libre de suero. Pasadas las 24hs de *starvation* las células fueron resuspendidas utilizando solución de disociación (*Gibco®*) las mismas se cuantificaron y se colocaron en la estufa a 37°C para su recuperación por 30 minutos. Para el ensayo de migración se utilizaron insertos para placas con membrana de 8.0 μm (*BIOFILM®*), en la placa se agregaron 500 μl de D-MEM con 10% SFB en cada *well*, por encima de cada membrana se colocaron 300 μl de medio sin suero conteniendo $1,5 \times 10^5$ células y se colocó la placa en estufa a 37°C. Una vez pasadas las 20 hs se fijaron y tiñeron las células en la membrana con una solución de cristal violeta y metanol. Se cuantificaron las migraciones por conteo directo por microscopio y los resultados se analizaron utilizando el *Gradpah Prims 6*.

2. Tiempo de duplicación

Se sembraron $1,5 \times 10^4$ células/*well* en placas de 24 *wells* y las mismas se dejaron crecer por distintos tiempos: 24, 48, 72 y 96 horas. Luego de esto, las mismas fueron fijadas y cuantificadas por el método de colorimetría con cristal violeta. Los tiempos de duplicación se calcularon utilizando los valores de la fase exponencial del crecimiento mediante un análisis estadístico comparando las curvas de ajuste no lineal utilizando el *software Gradpah Prims 6*.

3. Ciclo celular

La distribución del ciclo celular de células LN-229 y LN pin1 *K.O.* fue evaluada por citometría de flujo. Se sembraron 2 placas p100 de cada línea en medio completo D-MEM (SFB 10%). Una vez alcanzada una confluencia de 50-60% el medio completo fue reemplazado por medio fresco sin suero durante 48 horas para sincronizar las células. Pasado este tiempo se adicionó SFB al 10% solo a una de las placas para ambas líneas y 20 horas después las células fueron tripsinizadas, resuspendidas en PBS 0.1% SFB, fijadas en metanol frío 70% v/v, tratadas con 1 $\mu\text{g/ml}$ de RNasa A (*Sigma-Aldrich*) y por último teñidas con yoduro de propidio 100 $\mu\text{g/ml}$ por 30 minutos a 37°C protegidas de la luz. Se registraron un total de 1×10^4

eventos en un citómetro de flujo *FACSCalibur (BD)*. El análisis de los resultados se realizó con el software *FlowJo 7.6.2*.

4. Determinación de actividad telomerasa mediante qPCR

Se realizaron las mediciones correspondientes a la actividad telomerasa de las muestras utilizando el método de TRAP basado en SYBR Green. Para esto se usaron *primers* específicos denominados ACX y TS. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador *StepOne®*. La mezcla de reacción contuvo 2 μl de lisado proteico, Power Sybr Green Master Mix 1X (Applied Biosystem) y agua bidestilada. Para obtener el lisado proteico, se cuantificaron 2×10^6 células para cada línea y se lisaron las mismas en 200 μl de buffer CHAPS (10mM Tris pH 7,5; 1mM MgCl_2 ; 1mM EGTA; 5mM β mercaptoetanol; 0,5% CHAPS; 10% Glicerol), el cuál contenía RNase OUT (Invitrogen) y Cocktail Inhibidor de Proteasas (Sigma).

5. Expresión de il-8 y Tert

Para cada línea celular, se aisló el ARN total de las células usando el reactivo QuickZol (Kalium), siguiendo las instrucciones del proveedor. El ARN extraído fue cuantificado mediante absorbancia a 260; 230 y 280 nm, utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). La síntesis de ADNc se realizó a partir de 1µg de ARN total, utilizando oligodT 18 (PBL) y Retrotranscriptasa MMLV (PBL), siguiendo las instrucciones del proveedor. Para el Análisis de la transcripción de tert, il-8 y β Actina por Real Time PCR (qPCR). Se utilizaron *primers* específicos para cada gen. Los ensayos fueron llevados a cabo utilizando el termociclador StepOne®. La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 10µl, conteniendo 1µl de molde, Power Sybr Green Master Mix 1X (Applied Biosystem) y agua bidestilada. El gen de β Actina fue utilizado como control de carga. Los resultados fueron analizados mediante el método de $\Delta\Delta CT$ con el *StepOne® Software* versión v2.3.

Resultados y discusión

Validación de las líneas LN-229 pin1 K.O.

Se realizó la transfección del plásmido CRISPR-pin1, el cual fue construido a partir del plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) con la ligación del sgRNA dirigido al exón 1 del gen pin1. Una vez transfectadas las células, las mismas fueron tratadas con puromicina. Aquellas células que presentaban al menos una copia del plásmido fueron seleccionadas. Posterior a esta selección, se removió la puromicina del medio para dar lugar al crecimiento de las células. Sin embargo, esta selección no garantiza que el sistema CrisprCas9-pin1 haya funcionado correctamente. Por estos motivos decidimos evaluar la expresión proteica de Pin1 en la población celular obtenida comparándola con su versión *wild type* mediante dos técnicas distintas: *western blot* y citometría de flujo (Figura 1a,1b respectivamente)

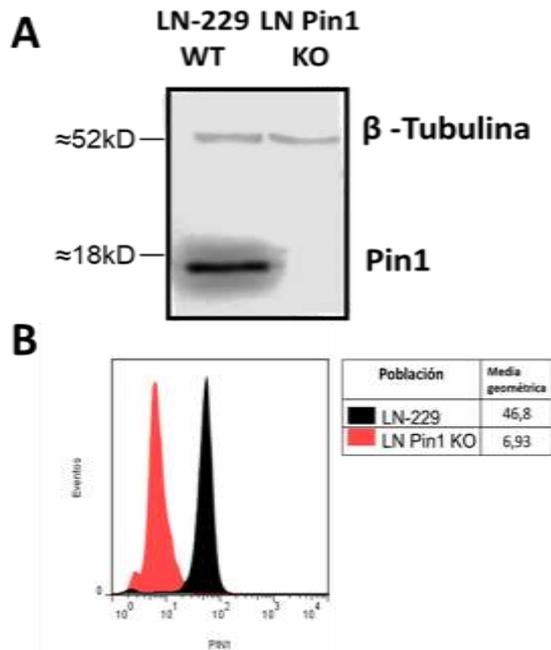
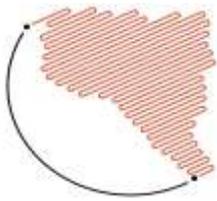


Figura 1. A) *Western blot* anti Pin1 de los lisados proteicos de las líneas evaluadas utilizando tubulina como control de carga. B) Citometría de flujo de las líneas celulares marcando con anticuerpo anti-Pin1.

Para ambos experimentos apreciamos una diferencia en la presencia de la proteína de interés entre ambas poblaciones celulares. Validando de esta forma el desarrollo de nuestro modelo celular de LN229 Pin1 *K.O.* con el cual se llevaron a cabo diferentes ensayos.

Caracterización de la línea LN Pin1 *K.O.*

Con la finalidad de validar Pin1 como un blanco molecular nos dispusimos en evaluar y comparar la línea Pin1 *K.O.* con su versión wild type en diferentes procesos celulares que se vinculan tanto a nuestra proteína blanco como al desarrollo y progresión tumoral:

MIGRACIÓN

Las líneas tumorales de GBM se caracterizan por presentar un fenotipo migratorio. Se ha vinculado a Pin1 como un promotor de la migración en distintos tipos de cánceres entre ellos glioblastoma (Wang, Liu, Wang, & Sun, 2017). Esto se desprende de la capacidad de esta enzima de regular la activación de la vía de β -catenina (Zhu et al., 2016).

Dada la importancia de Pin1 en este proceso decidimos evaluar la capacidad migratoria de nuestro modelo mediante ensayos de *transwells*. Observamos que la capacidad migratoria de la línea Pin1 *K.O.* disminuyó por debajo del 50% en comparación a la línea *WT* (Figura 2A,2B).

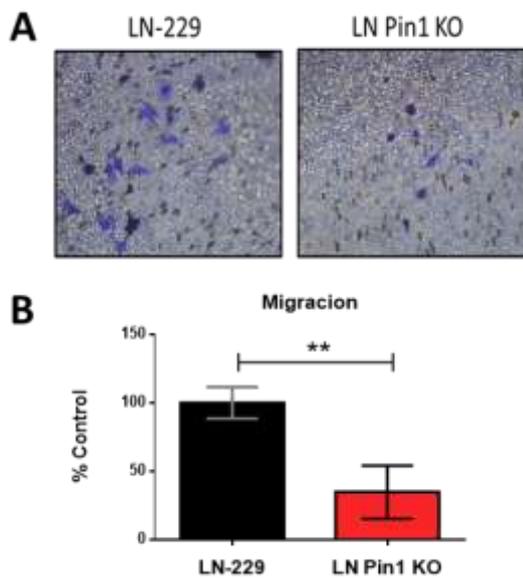
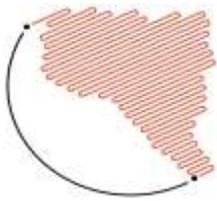


Figura 2.A) Imagen de la membrana de *transwells* con las células que migraron fijadas y teñidas con cristal violeta B) promedio del conteo de células con su desvío estándar para cada *well* expresado en porcentaje de control. n=2, se muestra promedio entre dos ensayos independientes, prueba de T de *student*, **p<0,01.

TIEMPO DE DUPLICACIÓN

Como se mencionó previamente, uno de los procesos celulares que se encuentra más caracterizado la vinculación de pin1 es la progresión del ciclo celular. Para evaluar el efecto de la delección de esta proteína en este proceso en un primer lugar decidimos determinar el tiempo de duplicación de nuestra línea celular generada. Para la versión *WT* obtuvimos un tiempo de duplicación de 34,6 hs que

correlaciona con lo reportado para esta línea celular. En cuanto a la versión pin1

K.O., se evaluaron dos repiques distintos y obtuvimos un tiempo de duplicación promedio más alto de 47,13 hs, correlacionando con lo visto en las curvas de crecimiento (Figura 3).

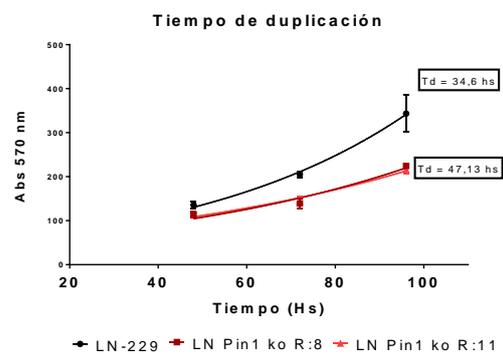


Figura 3. Curva de crecimiento celular para cada una de las líneas en la fase exponencial de la cual se desprende la determinación del tiempo de duplicación.

CICLO CELULAR

Continuando con la evaluación de nuestro modelo en el proceso de ciclo celular decidimos profundizar y determinar los distintos porcentajes de células en cada uno de las fases del ciclo. Para esto, para ambas líneas evaluamos dos grupos diferentes: un grupo sincronizado mantenido en *starvation* y otro sincronizado con el agregado de suero por

20hs como inducción para la progresión del ciclo celular. Se observó una diferencia en la respuesta a la inducción con SFB 10%, las células *K.O.* para el gen *pin1* no mostraron respuesta a la inducción en los tiempos evaluados, generando un arresto en la fase G0-G1 (Figura 4).

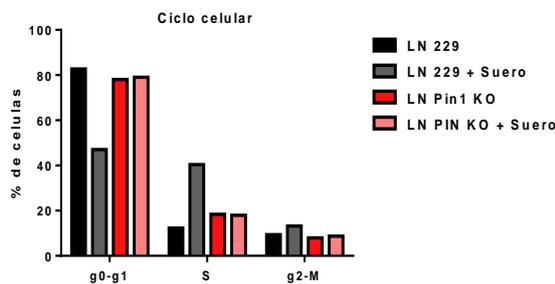


Figura 4. Porcentaje de poblaciones celulares en cada fase del ciclo celular para ambas líneas celulares.

ACTIVIDAD TELOMERASA

La expresión y la actividad de la enzima telomerasa constituyen en un factor de vital importancia para el desarrollo y la progresión tumoral. Como describimos, *Pin1* se encuentra vinculado a la regulación de la longitud telomérica por diversos mecanismos. En particular, *Pin1* participa regulando la activación de $\text{NF}\kappa\beta$, que a su vez, regula la expresión de *Tert* que constituye en la principal subunidad catalítica de la enzima telomerasa (Ghaffari et al., 2012). Por estos motivos

decidimos evaluar la actividad de esta enzima en ambas líneas mediante un ensayo de qPCR modificado utilizando una extracción proteica de las líneas como molde de la reacción. La capacidad de la enzima en elongar DNA en la línea *pin1 K.O.* disminuyó significativamente en más de un 50% (Figura 5).

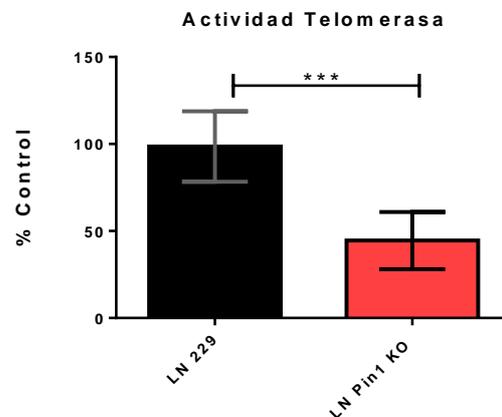


Figura 5. Determinación de la actividad telomerasa medida por qPCR expresada en porcentaje del control con su desvío estándar. $n=3$, se promedian tres ensayos independientes, prueba de T de *student*, *** $p<0,001$.

EXPRESIÓN DE il-8 y tert

Teniendo el objetivo de caracterizar el mecanismo molecular por el cual se explica la disminución de la actividad telomerasa de las células *K.O.* y a su vez, confirmar este resultado; Se comparó la expresión de los genes de il-8 y tert en ambas líneas.

Pin1 promueve la activación de NF κ B y consecuentemente promueve la expresión de diversos genes entre ellos tert e IL-8 (Atkinson et al., 2009; Ghaffari et al., 2012)

La expresión de tert se correlaciona directamente con la actividad de la enzima dado que este gen codifica para la principal subunidad catalítica de la misma. La línea *K.O.*, disminuye casi en un 50% la expresión de tert (Figura 6A) correlacionando con la disminución de la actividad telomerasa.

En cuanto a il-8, se obtuvo resultados similares donde se apreció una disminución significativa en su expresión (Figura 6B). Esto también correlacionan con la disminución de la actividad telomerasa dado que trabajos postulan la expresión de il-8 como un marcador de la actividad telomerasa (Solomon, Dong, Dogra, & Gupta, 2018).

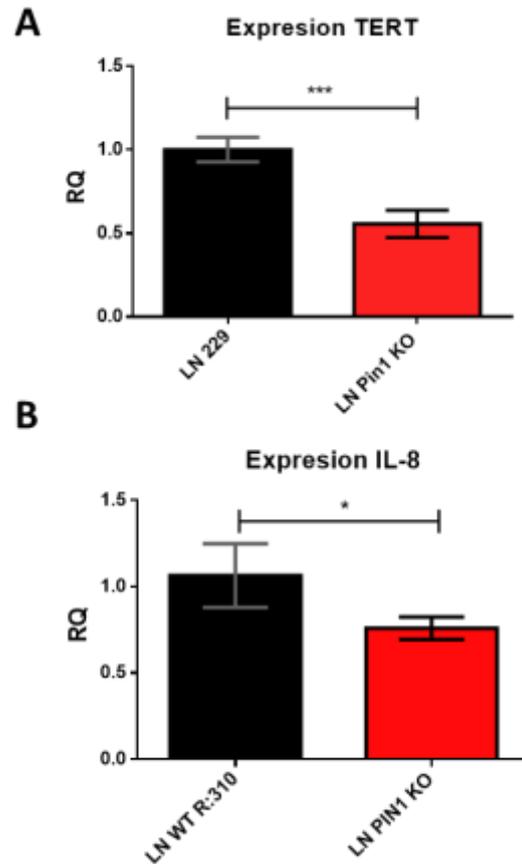


Figura 6. Comparación de los niveles de expresión de tert e il-8 con (A,B) respectivamente. n=2, prueba de T de student, ***p<0,001, *p<0,05.

Conclusión

En primer lugar, en cuanto al desarrollo del modelo celular LN229 Pin1 *K.O.*, podemos concluir que el sistema CRISPR/Cas9 con los sgRNA diseñados funcionaron correctamente. La sensibilidad del *western blot* no alcanzó a evidenciar presencia de la proteína Pin1 en el lisado correspondiente a las células transfectadas con la construcción. Este resultado se confirmó al evaluar por segunda vez la expresión de esta proteína por citometría de flujo donde se evidenciaron claramente dos poblaciones diferentes en el histograma, presentando solamente expresión de la proteína las células LN-229 *wt*. Estas células generadas constituyen hasta el momento como los únicos modelos celulares pin1-*K.O.* en glioblastoma, siendo un aporte de vital importancia para el estudio de esta enfermedad como para el estudio de los distintos roles de esta proteína.

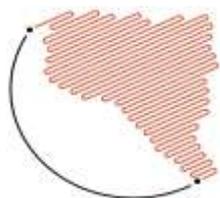
Partiendo de este modelo generado, se pudo iniciar una validación de Pin1 como blanco molecular para glioblastoma comparando la línea *K.O.* con su versión *wt* en diferentes procesos celulares vinculados a la progresión tumoral. Nuestros experimentos demostraron que la línea LN229 pin1 *K.O.*, disminuye marcadamente la capacidad migratoria respecto a la línea *wt*. En cuanto a la actividad telomerasa, la línea pin1 *K.O.* disminuye de forma significativa la

actividad de esta enzima, como a su vez, la expresión génica de la subunidad catalítica Tert. Esto podría deberse a una disminución en la activación de la vía de NF κ B como sugiere la disminución de expresión de IL-8, que es conocido tanto como un marcador de la vía como de actividad telomerasa. Finalmente se obtuvieron resultados similares al evaluar la progresión del ciclo celular donde vimos un arresto en la fase G₀-G₁, y un consecuente aumento en el tiempo de duplicación en LN Pin1 *K.O.*.

Todos estos resultados confirman la contribución de Pin1 en diversos procesos celulares vinculados a la tumorigénesis validando a esta proteína como un blanco molecular atractivo para el desarrollo de terapias novedosas para el tratamiento de glioblastoma.

Bibliografía

- Anjum, K., Shagufta, B. I., Abbas, S. Q., Patel, S., Khan, I., Shah, S. A. A., . . . Hassan, S. S. U. (2017). Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review. *Biomed Pharmacother*, 92, 681-689. doi:10.1016/j.biopha.2017.05.125
- Atabay, K. D., Yildiz, M. T., Avsar, T., Karabay, A., & Kilic, T. (2015). Knockdown of Pin1 leads to reduced angiogenic potential and tumorigenicity in glioblastoma cells. *Oncol Lett*, 10(4), 2385-2389. doi:10.3892/ol.2015.3512
- Atkinson, G. P., Nozell, S. E., Harrison, D. K., Stonecypher, M. S., Chen, D., & Benveniste, E.



- N. (2009). The prolyl isomerase Pin1 regulates the NF-kappaB signaling pathway and interleukin-8 expression in glioblastoma. *Oncogene*, 28(42), 3735-3745. doi:10.1038/onc.2009.232
- Ghaffari, S. H., Momeny, M., Bashash, D., Mirzaei, R., Ghavamzadeh, A., & Alimoghaddam, K. (2012). Cytotoxic effect of arsenic trioxide on acute promyelocytic leukemia cells through suppression of NFkbeta-dependent induction of hTERT due to down-regulation of Pin1 transcription. *Hematology*, 17(4), 198-206. doi:10.1179/1607845412Y.0000000008
- Huttner, A. (2012). Overview of primary brain tumors: pathologic classification, epidemiology, molecular biology, and prognostic markers. *Hematol Oncol Clin North Am*, 26(4), 715-732. doi:10.1016/j.hoc.2012.05.004
- Lee, T. H., Tun-Kyi, A., Shi, R., Lim, J., Soohoo, C., Finn, G., . . . Lu, K. P. (2009). Essential role of Pin1 in the regulation of TRF1 stability and telomere maintenance. *Nat Cell Biol*, 11(1), 97-105. doi:10.1038/ncb1818
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., . . . Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 114(2), 97-109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4
- Lu, K. P., & Zhou, X. Z. (2007). The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(11), 904-916. doi:10.1038/nrm2261
- Min, S. H., Zhou, X. Z., & Lu, K. P. (2016). The role of Pin1 in the development and treatment of cancer. *Arch Pharm Res*, 39(12), 1609-1620. doi:10.1007/s12272-016-0821-x
- Naderlinger, E., & Holzmann, K. (2017). Epigenetic Regulation of Telomere Maintenance for Therapeutic Interventions in Gliomas. *Genes (Basel)*, 8(5). doi:10.3390/genes8050145
- Nasser, M. M., & Mehdipour, P. (2017). Exploration of Involved Key Genes and Signaling Diversity in Brain Tumors. *Cell Mol Neurobiol*. doi:10.1007/s10571-017-0498-9
- Ranganathan, R., Lu, K. P., Hunter, T., & Noel, J. P. (1997). Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. *Cell*, 89(6), 875-886.
- Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M. R., Schnapp, G., & de Lange, T. (2000). Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol*, 20(5), 1659-1668.
- Solomon, P., Dong, Y., Dogra, S., & Gupta, R. (2018). Interleukin 8 is a biomarker of telomerase inhibition in cancer cells. *BMC Cancer*, 18(1), 730. doi:10.1186/s12885-018-4633-x
- Vredenburgh, J. J., Desjardins, A., Herndon, J. E., 2nd, Dowell, J. M., Reardon, D. A., Quinn, J. A., . . . Friedman, H. S. (2007). Phase II trial of bevacizumab and irinotecan in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res*, 13(4), 1253-1259. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2309
- Wang, J., Liu, K., Wang, X. F., & Sun, D. J. (2017). Juglone reduces growth and migration of U251 glioblastoma cells and disrupts angiogenesis. *Oncol Rep*, 38(4), 1959-1966. doi:10.3892/or.2017.5878
- Zhu, Z., Zhang, H., Lang, F., Liu, G., Gao, D., Li, B., & Liu, Y. (2016). Pin1 promotes prostate cancer cell proliferation and migration through activation of Wnt/beta-catenin signaling. *Clin Transl Oncol*, 18(8), 792-797. doi:10.1007/s12094-015-1431-7

Financiamiento

Este proyecto se lleva a cabo gracias a una beca doctoral CONICET. A su vez el mismo se encuentra financiado principalmente por el Programa de la Universidad Nacional de Quilmes (PUNQ): "Identificación de Nuevos Blancos Terapéuticos" (Director: Dr. Daniel Gómez, Co-director: Dr. Daniel Alonso)