



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 406**

51 Int. Cl.:
G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06770985 .7**

96 Fecha de presentación : **23.05.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1889057**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.02.2008**

54 Título: **Inhibidores de la actividad del transactivador PGHS-2.**

30 Prioridad: **23.05.2005 US 683626 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.11.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.11.2009

73 Titular/es: **Ordway Research Institute, Inc.**
150 New Scotland Avenue
Albany, New York 12208, US
Huiyu Cao,
Hung-Yun Lin,
Paul J. Davis y
Faith B. Davis

72 Inventor/es: **Cao, Huiyu;**
Lin, Hung-Yun;
Davis, Paul J. y
Davis, Faith B.

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Inhibidores de la actividad del transactivador PGHS-2.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con inhibidores de la función de transactivación PGHS-2 y en particular con métodos para seleccionar inhibidores de la transactivación PGHS-2.

10 **Antecedentes de la invención**

La prostaglandina-endoperoxido H sintasa (PGHS) es una enzima que limita el índice en la producción de prostaglandinas (Smith *et al.*, 1996). El PGHS cataliza la ciclooxygenación del ácido araquidónico a prostaglandina G₂ (PGG₂) y la reducción del PGG₂ a prostaglandina H₂ (PGH₂). El PGH₂ luego se metaboliza por diferentes sintetas a prostanoides de función variable, que incluye las prostaglandinas PGD₂, PGE₂, PGF_{2α} y PGI₂, y tromboxano (TXA₂) (Smith and DeWitt, 1996). El *PGHS-1* y el *PGHS-2* son genes de copia única que se han mapeado en los cromosomas humanos 9 y 1, respectivamente (Xu *et al.*, 1993; Funk *et al.*, 1991). El *PGHS-1* se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos (Smith *et al.*, 2000). En contraste, el *PGHS-2* es un gen de respuesta temprana inmediata que es altamente inducible de células no malignas por las citoquinas y los estímulos inflamatorios (Cao *et al.*, 2003; Cao and Smith, 1999; Cao *et al.*, 1998). Es distinta del *PGHS-1* con respecto a la secuencia del ADN, la estabilidad de su mRNA es respuesta a varios estímulos.

En muchas líneas celulares de cáncer y en tejidos de cáncer, sin embargo, el *PGHS-2* se expresa constitutivamente (Davies *et al.*, 2002). La importancia del *PGHS-2* para la biología de la célula tumoral se ha atribuido en parte a las actividades angiogénicas dependientes de (VEGF)- factor de crecimiento endotelial vascular del PGE₂ y del PGI₂ que apoyan el crecimiento tumoral (Gately and Li, 2004). La colocalización e interacción del *PGHS-2* con caveolin-1, que se segrega de la fábrica de síntesis de prostaglandina general en el retículo endoplasmático y la cubierta nuclear, puede contribuir a la tumorigénesis y a la inflamación (Liou *et al.*, 2001). El PGE₂ también puede inhibir la apoptosis y la vigilancia inmune (Hoshino *et al.*, 2003; Ishaque *et al.*, 2003) y el PGE₂ induce ciertas proteínas de reparación del ADN (Ku70 y Ku80) cuya expresión puede estar relacionada con la proliferación de las células de cáncer gástrico humano y la carcinogénesis (Lim *et al.*, 2002).

La expresión del *PGHS-2* se ha asociado con carcinomas de mama menos diferenciados y más agresivos y así puede ser un indicador de tejido útil de la prognosis, así como también el blanco para la terapia de fármaco (Wulffing *et al.*, 2004). La sobreexpresión del *PGHS-2* se ha reportado porque ocurre en más del 40% de los cánceres de mama invasivos humanos y el 60% de los carcinomas ductales *in situ* (Wang and Dubois, 2004). La expresión del *gen 1 de resistencia multifármaco* se incrementa cuando el *PGHS-2* se sobreexpresa experimentalmente, sugiriendo que el *PGHS-2* contribuye a la resistencia multifármaco en tumores (Patel *et al.*, 2002). Además, Subbaramaiah *et al.* (2002) ha mostrado que la hiperexpresión del *PGHS-2* se asocia con la expresión excesiva del *HER-2/neu* en cánceres de mama a través del mejoramiento de la señal Ras.

Resumen de la invención

Reportamos aquí la presencia de la proteína PGHS-2, pero no del PGHS-1, en el núcleo celular de las células tumorales y mostramos que el PGHS-2 se une a la región promotora de su propio gen y puede funcionar como un transactivador. Proponemos que este mecanismo de retroalimentación positivo directo contribuye a la expresión constitutiva del PGHS-2 en células cancerosas. La presente invención, por lo tanto, suministra un método para seleccionar los inhibidores selectivos de la función del transactivador del PGHS-2 que se podría utilizar como agentes terapéuticos en el tratamiento de cáncer, sin los efectos colaterales adversos asociados con los inhibidores del PGHS-1.

En un aspecto, por lo tanto, la invención se relaciona con un método para identificar los inhibidores de la expresión constitutiva del PGHS-2 mediante la inhibición de su actividad de transactivación, en donde el método comprende las etapas de poner en contacto una sonda de ácido nucleico que corresponde a por lo menos una región del promotor *PGHS-2* o *MDM2* con la proteína PGHS-2 en la presencia y ausencia de un compuesto de prueba y determinar el nivel de unión de la proteína PGHS-2 al promotor. Una disminución en la cantidad de la proteína unida en la presencia de dicho compuesto de prueba comparado con la cantidad de proteína unida en la ausencia de dicho compuesto de prueba indica que el compuesto es un inhibidor potencial de la actividad de transactivación del PGHS-2.

En una modalidad, el nivel de unión se determina mediante un ensayo de unión de la proteína de ADN, por ejemplo un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina o un ensayo de cambio de movilidad electroforético (EMSA).

En una modalidad, la sonda de ácido nucleico corresponde a una región del promotor *PGHS-2*: un sitio c/EBP, un sitio CRE o un sitio NF - κB y la sonda se marca.

En una modalidad, la sonda de ácido nucleico es biotinilada y se incuba con glóbulos recubiertos con estreptavidina de tal manera que las proteínas del extracto nuclear unidas a las sondas se pueden aislar y posteriormente eluir de los glóbulos.

En un aspecto relacionado, la presente invención se relaciona con un método para seleccionar inhibidores de PGHS-2, en donde el método comprende obtener una célula que produce constitutivamente PGHS-2, en donde la célula se ha transfectado con un primer ácido nucleico que corresponde a una región del promotor *PGHS-2* y a un segundo ácido nucleico que codifica la molécula reportero; exponer la célula a un compuesto de prueba; aislar un extracto nuclear de la célula; y comparar el nivel de la molécula reportero en dicho extracto con el nivel de la molécula reportero en un extracto nuclear de células no expuestas, en donde una disminución en el nivel de la molécula reportero es indicativa de la inhibición de transactivación de PGHS-2. la molécula reportero puede ser, por ejemplo, luciferasa o una proteína de fluorescencia verde.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Localización del PGHS-1 y el PGHS-2 en las líneas de célula cancerosa DU145 y UM-SSC-22B (22B) y las células endoteliales ECV 304.

A: El tñido inmunofluorescente del PGHS-1 y el PGHS-2 en el ECV 304, las líneas celulares de próstata (DU145), y cabeza y cuello (UM-SSC-22B). las células ECV 304, DU145 y UM-SSC-22B se sometieron a tñido inmunofluorescente indirecto utilizando anticuerpo monoclonal al PGHS-I y el PGHS-2 humano seguido por un anticuerpo anti-ratón de cabra marcado con Alexa-488. primeros 3 paneles: anticuerpo a PGHS-I; últimos 3 paneles: anticuerpo a PGHS-2.

B: Localización subcelular de tñido de inmunofluorescencia para PGHS-1 y PGHS-2 en células UM-SSC-22B. Estas células, que expresan constitutivamente tanto el PGHS-1 como el PGHS-2, se sometieron a tñido de inmunofluorescencia indirecto (verde) y tñido nuclear con yoduro de TO-PRO-3 (rojo). El PGHS-2 nuclear, pero no el PGHS-1 se demuestra mediante la superimposición del tejido PGHS-2 sobre el tñido nuclear, creando un color amarillo-naranja.

Figura 2. Expresión de las células.

A: PGHS-2 en ECV 304, DU145 y UM-SSC-22B (22B) Expresión constitutiva de la proteína PGHS-2 en las células ECV 304, DU145 y UM-SSC-22B. Las células crecieron para tener confluencia en platos de 10 cm. Las monocapas fueron tratadas con y sin PMA (100 nM) durante 12 h; las proteínas nucleares fueron entonces cosechadas y sometidas a inmunotransferencia con PGHS-2 antihumano (panel 1) o PGHS-1 (panel 2). La gráfica de barras muestra los cambios del control en las intensidades de imagen de banda nuclear o de citosol (medio: 1: SD) con cada tratamiento, de los resultados de los tres experimentos.

B: Niveles del mRNA del PGHS-2 en células ECV 304, DU145 y UM-SSC-22B. Las células confluentes fueron tratadas con o sin PMA (100 nM) durante 8 h. Las muestras de ARN total fueron cosechadas y sometidas a RT-PCR utilizando los iniciadores PGHS-2 o GAPDH (paneles superior e inferior, respectivamente). La gráfica de barras muestra los incrementos en los niveles de PGHS-2 mRNA relativos al control de las muestras (medio $\pm$ SD) y corregidos para cambios en el GAPDH en las mismas muestras, resumidas de los resultados de los tres experimentos.

Figura 3. Expresión del PGHS-2 en células UM-SSC-22B (22B) en inhibidores atenuados de MAPK, p38 o NF- κ B.

A: Efectos de la activación de PKC o los inhibidores de la senda de señalización de la expresión del PGHS-2. A las células UM-SSC-22B se les permitió crecer para tener confluencia en platos de cultivo de 10 cm, y luego medio de control (carril 1) o medio que contiene PMA (carril 2, 100 nM), PD98059 (PD, carril 3, 10 μ M), SB203580 (SB, carril 4, 10 μ M) o PDTC (carril 5, 100 μ M) durante 16 h. Las monocapas fueron cosechadas y 40 μ g de proteína nuclear se sometió a inmunotransferencia con PGHS-2 anti-humano (panel superior) o anti-pMAPK (pERK1/2, panel inferior). La gráfica de barras de adelante muestra las intensidades de banda en las muestras de control y las células tratadas con los agentes indicados, los resultados mostrados son las medias SD de tres experimentos similares

B: Efecto de la transfección ERK1/2 negativa dominante sobre la expresión del PGHS-2 en células UM-SSC-22B. Las células fueron transfectadas con mutantes negativos dominantes del ERK 1 (dnERK1), ERK2 (dnERK2), ambos mutantes o vectores vacíos (pCEP40). Las preparaciones nucleares fueron analizadas mediante western blotting para PGHS-2 y pMAPK (ERKs 1 y 2 fosforilados).

Figura 4. Producción de PGE₂ en células ECV 304, UM-SSC-22B (22B) y DU145.

Las células fueron puestas en placas en platos de cultivo de 42 pozos y tratadas con o sin PMA (100 nM), NS398 (10 μ M), indometacina (10 μ M) o PD98059 (10 μ M) durante 12 h. Las células fueron transfectadas a 200 μ l de PBS durante los últimos 30 min. Las muestras fueron entonces recolectadas y sometidas a análisis cuantitativo del PGE₂ mediante ELISA. Los resultados se muestran como la media $\pm$ SD de los resultados de tres estudios representativos.

Figura 5. El PGHS-2 se asocia con c-Fos, MDM2 y p300.

Las células UM-SSC-22B (22B) confluentes fueron tratadas con PMA, 100 nM, o disolvente solo durante 12 h. El núcleo celular fue preparado (Lin *et al.*, 1999) e inmunoprecipitado con anticuerpo al PGHS-2. Las proteínas

inmunoprecipitadas fueron separadas mediante electroforesis de gel e inmunotransferencia con anticuerpo al c-Fos, MDM2 o P300. Se muestran inmunotransferencias representativas de tres experimentos similares. La co-localización del c-Fos con PGHS-2 se ven en el núcleo de las células UM-SSC-22B.

Figura 6. Las células UM-SSC-22B (22B) quiescentes en cultivos exhiben una actividad promotora PGHS-2 sustancial.

Las células UM-SSC-22B fueron transfectadas con las construcciones promotoras PGHS-2 -831/+123 fusionadas al reportero luciferasa o al reportero luciferasa con el promotor SV 40 (promotor pGL2).

Las alícuotas de las células fueron tratadas con PMA (100 nM), PD98059 (10 μ M), PDTC (100 μ M), o SB203580 (10 μ M) durante 12 h. Los cultivos fueron co-transfectados con plásmidos reporteros de β -galactosidasa, y la actividad luciferasa, corregida para actividad de β -galactosidasa, medido y expresado como la media $\pm$ SD de las determinaciones del cultivo triplicado de los tres experimentos.

Figura 7. Análisis de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de la unión de PGHS-2 al promotor PGHS-2.

A: El ChIP se desarrollo con un anticuerpo PGHS-2, utilizando células UM-SSC-22B (22B) que expresan constitutivamente el PGHS-2, en ausencia del (Con) o presencia del PMA (100 nM), PDTC (100 μ M) o PD98059 (PD, 10 μ M) durante 12 h. El ADN de entrada e inmunoprecipitado (IP) fue amplificado al utilizar iniciadores para MDM2, el promotor PGHS-2 y el ORF PGHS-2, y los ADN amplificados fueron entonces separados mediante electroforesis y explorados con el Sistema de Imágenes Versa-DOC™.

B: Unión del PGHS-2 al NF - κ B (-213/-222; -438/-447) específico del PGHS-2, C/EBP (-132/-124) y la secuencia CRE (-59/53). Las células UM-SSC-22B (22B) confluentes fueron tratadas con y sin PMA (100 nM) durante 6h y se prepararon los extractos nucleares. Una sonda de ADN promotora PGHS-2 biotinilada se incubó con glóbulos de estreptavidina durante 1-h; los glóbulos paletizados se recolectaron y se lavaron, las proteínas se eluyeron y se sometieron a análisis western blot utilizando un anticuerpo anti-PGHS-2.

Figura 8. La proteína PGHS-2 incrementa la actividad promotora PGHS-2 en las células 293T.

Las células 293T ochenta por ciento confluentes fueron transfectadas transitoriamente con concentraciones crecientes del vector de expresión PGHS-2 en PCMV, o el vector de control, y el promotor PGHS-2 (-831/+123) fusionado a un reportero de luciferasa. El PCMV β -Gal fue transfectado para controlar la eficiencia transfeccional. La actividad de luciferasa se determinó mediante un sistema de doble luz. La gráfica muestra el cambio de la actividad luciferasa con relación al valor de control de 1, obtenido de los datos en tres experimentos.

Descripción detallada de la invención

Localización subcelular del PGHS-1 y el PGHS-2 en líneas de célula cancerosa

Estudios previos de localización subcelular las isoformas PGHS han mostrado que el PGHS-1 y el PGHS-2 se encuentran ambos en el retículo endoplásmico y en la cubierta nuclear de fibroblastos y macrófagos y que no existe diferencia sustancial en la distribución subcelular de las dos isozimas (Morita *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1981; Rollins *et al.*, 1980; Kujubu *et al.*, 1993). En los estudios habituales, comparamos las distribuciones del PGHS-1 y el PGHS-2 en las células cancerosas de próstata humana (DU145) y de cabeza y cuello (UM-SSC-22B). Se muestran en la Figura 1 fotomicrografías con focales de células cancerosas teñidas mediante inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos primarios específicos para el PGHS-1 o PGHS-2. La inmunoreactividad del PGHS-1 fue distribuida homogéneamente en citoplasmas periféricos. El PGHS-1 es conocido por estar presente en el retículo endoplasmático de muchas células y es probable que el teñido fluorescente del PGHS-1 que observamos principalmente reflejan la localización de la enzima en el retículo endoplasmático.

En contraste al PGHS-1 y al PGHS-2 en las células cancerosas se concentraron en la cubierta nuclear y estaba presente en cantidades abundantes *dentro* del núcleo de la célula (Figura 1). Los resultados de las líneas celulares cancerosas se compararon con aquellas de las células endoteliales (ECY 304). Solamente la inmunoreactividad del PGHS-2 en trazas apareció en el citoplasma de las células ECY 304 y no hubo teñido de PGHS-2 en la cubierta nuclear o dentro de los núcleos de estas células. Como se muestra en la Figura 1B, el teñido de fluorescencia del PGHS-2 (verde) se traslapa con el teñido nuclear (rojo). De otra parte, el teñido del PGHS-1 en las células UM-SSC-22B no se traslapa con el teñido nuclear.

Relación de altos niveles de la proteína PGHS-2 y el mRNA en las líneas de célula cancerosa a una actividad elevada de NF - κ B, MAPK (ERK1/2) y p38

Los western blots y las nucleoproteínas obtenidas mediante fraccionamiento de las células DU145 y UM-SSC-22B mostraron que la proteína PGHS-2 se recuperó en las fracciones nucleares de estas células, más así en las células UM-SSC-22B que en las células DU145 (Figura 2A). Los niveles de mRNA *PGHS-2* también se encontraron por ser fácilmente detectables en las células cancerosas DU145 y UM-SSC-22B (Figura 2B). Los niveles de la proteína PGHS-2 y el mRNA fueron detectables en células ECY 304 no tratadas. Se debe notar que estos hallazgos se hicieron en células

no expuestas a citoquinas o a factores de crecimiento que puedan influenciar los niveles de PGHS-2 celular y originar la translocación nuclear de la enzima (Liou *et al.*, 2001). La proteína PGHS-1 fue abundante en las células cancerosas de cabeza y cuello (UM-SSC-22B), así como también en las células de cáncer de próstata DU145 y endoteliales ECV 304 (Figura 2A).

El acetato de forbol-miristato (PMA) en estudios de corto plazo activa la proteína quinasa C (PKC) e induce rápidamente la transcripción del gene PGHS-2 (Pang *et al.*, 2002). En las tres líneas celulares estudiadas aquí, la abundancia del PGHS-2 mRNA de la proteína PGHS-2 en núcleos se incrementó mediante el tratamiento de células con PMA (Figura 2A y B), con la mayoría de los cambios marcados vistos en las células UM-SSC-22B. El PGHS-2 Citosólico también se incrementó con el tratamiento PMA (Figura 2A). Como se esperaba, la incubación de las líneas de célula cancerosa con PMA (100 nM) durante 12 h no tuvo efecto sobre la abundancia del PGHS-1.

La evidencia desarrollada en todas partes indica que el MAPK, p38 y el NF - κ B juega papeles importantes en la regulación hacia arriba del PGHS-2 en respuesta a las citoquinas y a los factores de crecimiento en las células normales (Goppelt-Strube *et al.*, 2000; Wang and Tai, 1998). Por lo tanto nosotros estudiamos si el MAPK, p38 y NF - κ B estaban implicados en la expresión constitutiva del PGHS-2 en las células cancerosas. Cuando las células UM-SSC-22B confluyente fueron tratadas durante 12 h con PD98059 (10 μ M, un inhibidor de la cascada MAPK en la quinasa MAPK (MEK), la proteína PGHS-2 disminuyó a niveles muy bajos. SB23058, un inhibidor de la senda de quinasa p38, y ditiocarbamato de pirrolidina (PDTC), un inhibidor del NF - κ B, inhibió mínimamente la expresión del PGHS-2 en las células UM-SSC-22B (Figura 3A). Aunque el PKC es integral a la expresión constitutiva del PGHS-2 en las líneas celulares tumorales estudiadas aquí, y el PMA se mostró por incrementar los niveles de PGHS-2 en esta figura, estos resultados indican que existen múltiples sendas de señalización intracelular involucradas en la expresión constitutiva de las células PGHS-2 en UM-SSC-22B.

Nosotros transfectamos células UM-SSC-22B con plásmidos de expresión ERK1 y/o ERK2 negativos dominantes. Individualmente, el dnERK1 o e dnERK2 tuvo poco efecto sobre la expresión del PGHS-2 (Figura 3B). Como se esperaba, el dnERK1 y 2 inhibieron juntos la actividad quinasa de ambas isoformas conduciendo a una expresión disminuida del PGHS-2, aunque la fosforilación de los ERK mutantes se vio (Figura 3B). Esta última respuesta se ha descrito previamente por Robbins *et al.* (1992). Este conjunto de resultados sugiere que la expresión constitutiva del PGHS-2 en las células de cáncer de próstata es en parte dependiente de las sendas de transducción de señal MAPK y NF - κ B.

Elaboración del PGE₂ mediante células cancerosas y células ECV 304

Las células de cáncer de próstata y cuello y cabeza produjeron niveles de PEG₂ (12.7 ± 1.3 ng/ml y 14.3 ± 1.5 ng/ml [media $\pm$ SD], respectivamente) que fueron similares a aquellas de las células endoteliales no cancerosas (ECV 304, 10.1 ± 1.2 ng/ml) (Figura 4). El PMA (100 nM) se ha mostrado en cualquier parte por mejora a producción de PGE₂ en un número de líneas celulares (Habib *et al.*, 1995; Molina-Holgado *et al.*, 2000). En los estudios presentes, sin embargo, el PMA no incrementa significativamente la producción de PGE₂ en células DU145 o UM-SSC-22B (Figura 4). El PD98059 disminuye la producción de PEG₂ en células cancerosas a niveles basales, como lo hizo la indometacina, un inhibidor no específico de PGHS-1 y PGHS-2, y NS398, un inhibidor selectivo de PGHS-2. Aunque la expresión incrementada inducida por PMA del PGHS-2 no dio como resultado niveles significativamente superiores de producción de PGE₂ en células DU145 y UM-SSC-22B, la producción de PEG₂ se sometió a una regulación hacia abajo mediante los inhibidores convencionales de la actividad de la enzima PGHS-2.

Asociación del PGHS-2 nuclear con otros activadores transcripcionales en líneas celulares de cáncer

Para investigar si el PGHS-2 se asocia con nucleoproteínas transcripcionalmente activas, experimentos de teñido de anticuerpo doble fueron llevados a cabo en células UM-SSC-22B quiescentes, y demostraron que el c-Fos y el PGHS-2 se co-localizó en núcleos celulares (Figura 5). Estudios de co-inmunoprecipitación también indicaron que el PGHS-2 nuclear se asocia con el MDM2 y con la proteína co-activadora nuclear p300. El MDM2 es un determinante del cambio de p53 y, cuando se une a p53 facilita la exportación nuclear de la proteína supresora del oncogen (Mond *et al.*, 1992). El tratamiento de las células UM-SSC-22B con PMA, 100 nM, originó un incremento marcado en la asociación nuclear del PGHS-2 con el c-Fos (Figura 5), pero poco incremento en asocio con el MDM2 o el p300.

PGHS-2 que se une al promotor PGHS-2 y a otros genes que modulan la división celular.

Para evaluar la actividad promotora del PGHS-2 en células UM-SSC-22B, los pares base -831/+123 próximos del promotor PGHS-2 humano se fusionó a un reportero de luciferasa (pGHS-2 LUC) (Cao *et al.*, 1999). Este reportero PGHS-2 o SV40 LUC (promotor pGL2) se transfectaron en células tumorales UM-SSC-22B de confluencia cercana. Como lo indica la Figura 6, la actividad promotora del PGHS-2 fue detectada fácilmente en células UM-SSC-22B quiescentes y fue similar a aquella obtenida con la transfección del promotor SV 40 y el reportero luciferasa. Este resultado es consistente con la expresión constitutiva del PGHS-2 encontrada en las células UM-SSC-22B. Mientras el PMA (100 nM) solo incrementó insignificamente la actividad promotora PGHS-2, el tratamiento de las células con PD98059, PDTC, o SB203580 inhibió la actividad promotora PGHS-2. Estos resultados implican que la senda de transducción de la señal MAPK y el NF - κ B es una expresión constitutiva del PGHS-2.

En los experimentos CHIP en células de cáncer de próstata, que utilizan anti-PGHS-2 monoclonal, comparamos la cantidad de la secuencia promotora *PGHS-2* inmunoprecipitable con la cantidad de ADN de entrada para cada muestra; un cebador ORF *PGHS-2* sirvió como control negativo. Encontramos que el PGHS-2 se unió constitutivamente al promotor *PGHS-2* y el tratamiento PMA de las células dio como resultado un incremento mínimo en la unión del PGHS-2 al promotor (Figura 7A). El PGHS-2 también se unió a la región promotora del *MDM2*. La unión del PGHS-2 a ambos promotores se inhibió mediante PDTC y PD98059, sugiriendo dependencia de estos efectos sobre la activación del NF - κ B y MAPK.

Luego definimos que dominios del promotor *PGHS-2* eran capaces de unirse a la proteína PGHS-2. Utilizamos un ensayo de unión de proteína de ADN en el cual la sonda de oligonucleótido promotora *PGHS-2* biotinilada corta se incubó con glóbulos recubiertos de estreptavidina previamente interactuados con proteínas de extracto nuclear. Como se muestra en la Figura 7B, el PGHS-2 se unió al c/EBP, CRE y a dos sitios NF - κ B sobre el promotor *PGHS-2*. Hubo solo una unión débil en la secuencia de ADN entre los dos sitios NF - κ B en la región promotora *PGHS-2*.

También se determinó si la unión del PGHS-2 a su propio promotor tuvo algún efecto sobre la actividad transcripcional del promotor. Un plásmido de luciferasa impulsado por el promotor *PGHS-2* fue co-transfectado con los plásmidos de expresión *PGHS-2* en las células 293T. Estas células fueron utilizadas porque su propio contenido endógeno del PGHS-2, como alteraciones en la actividad transcripcional del *PGHS-2* podía no ser evaluado en las líneas celulares en las cuales el gen está constitutivamente expresado. Cuando la cantidad de la proteína PGHS-2 se incrementó en las células 293T a las 24 h después de la transfección de los plásmidos de expresión *PGHS-2*, la actividad de luciferasa se incrementó (Figura 8). Así, la unión del PGHS-2 a su propio promotor suministró retroalimentación positiva de la transcripción de gen *PGHS-2*. En contraste, la transfección del vector de expresión vacío no afectó la actividad promotora *PGHS-2*.

25 Discusión

Mucha de la atención reciente se ha dirigido a las enzimas PGHS en células cancerosas (Zimmermann *et al.*, 1999; Yoshimura *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2002; Xiong *et al.*, 2003). Localizadas en el citoplasma, particularmente en la región perinuclear y en el retículo endoplasmático, estas enzimas están involucradas en la producción de prostanoide que mediante varios mecanismos pueden apoyar el crecimiento tumoral (Gately, 2000; Hendrickx *et al.*, 2003; Pai *et al.*, 2002). El PGHS-1 expresado constitutivamente se ha asumido que es particularmente relevante a este respecto, porque el PGHS-2 es visto como una enzima inducible con papeles importantes en las respuestas inflamatorias en las cuales participan las células no cancerosas (Cao *et al.*, 2003; Cao and Smith, 1999; Han *et al.*, 2002). La evidencia de varios laboratorios, sin embargo, indica que el PGHS-2 se puede expresar constitutivamente en células de cáncer (Howe *et al.*, 2001; Hanahan and Weinberg, 2000). De hecho, el *PGHS-2* se encontró en los estudios habituales como constitutivamente expresado en las líneas celulares de cáncer de próstata, y cabeza y cuello, pero no en la línea celular endotelial no cancerosa immortalizada (ECV 304). El posible significado de tales hallazgos se sugiere mediante observaciones de que drogas anti-inflamatorias no esteroides (NSAID) que inhibe la actividad enzimática tanto del PGHS-1 como del PGHS-2 pueden servir como función protectora contra el desarrollo de varios tumores (Arber and DuBois, 1999; Moran EM, 2002; Oshima *et al.*, 1996; Davies GL, 2003; Piazzuelo *et al.*, 2003; Parfenova *et al.*, 2001).

La microscopia confocal en los presentes estudios reveló que la proteína PGHS-2 no solo se encontraba en un sitio perinuclear, sino que era abundante dentro del núcleo de estas líneas celulares de cáncer. Aunque la proteína PGHS-2 se ha reportado por estar presente en el núcleo de células no cancerosas, esta translocación del PGHS-2 ha sido el resultado del tratamiento de citoquina u otras manipulaciones y no ha sido constitutivo (Parfenova *et al.*, 2001; Marvin *et al.*, 2000). Nuestro hallazgo de PGHS-2 nuclear se confirmó mediante dos técnicas (microscopia confocal, fraccionamiento de celda) y nos hizo investigar la posibilidad de que el PGHS-2 tenga una función transcripcional distinta de su papel enzimático bien descrito.

Los estudios de inmunoprecipitación de cromatina revelaron que el PGHS-2 se unió a la región promotora del *PGHS-2* en la próstata humana y en las líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello. Identificamos los varios dominios específicos de la región promotora *PGHS-2* en la cual ocurrieron las interacciones con la proteína ADN-PGHS-2. En estudios transcripcionales llevados a cabo en células 293T en las cuales se transfectaron construcciones relevantes, mostramos que la proteína PGHS-2 fue capaz de regular directamente la transcripción de su propio gen. Extrapolando estos resultados a las células de cáncer, proponemos que el mecanismo de la expresión "constitutiva" del gen de *PGHS-2* de las células de cáncer pueda ser la fusión transactivadora de su propio producto de gen.

Varias líneas de evidencia han implicado NF - κ B, proteína quinasa activada con mitógeno, involucramiento del C/EBP y CRE en la regulación hacia arriba de las proteínas PGHS-2 (Zhu *et al.*, 2002). Utilizando un ensayo de unión de proteína-ADN, encontramos que el PGHS-2 de hecho se une fuertemente a los dos sitios NF - κ B y a los sitios C/EBP y CRE de la región promotora *PGHS-2*. El PGHS-2 unió solo débilmente a las secuencias de control entre los sitios NF - κ B del promotor *PGHS-2*, no determinó si el PGHS-2 se une directamente a su propio promotor o se une en asocio con otros activadores.

Un hallazgo adicional fue que la proteína PGHS-2 se unió al promotor *MDM2*. Si el PGHS-2 funciona como un transactivador para el *MDM2*, entonces éste se vuelve un mecanismo por medio del cual la célula de cáncer que expresa constitutivamente *PGHS-2* pueda regular los niveles celulares de la proteína supresora del oncogen, p53. El

MDM2 se une al dominio de activación transcripcional del p53 en el núcleo y origina la translocación de la proteína al citoplasma donde el p53 es rápidamente degradado (Momand *et al.*, 1992).

Los presentes estudios también revelaron que el PGHS-2 se compleja con varias nucleoproteínas. Estas proteínas incluyen c-Fos, la cual, cuando se une a c-Jun, es un transactivador (AP-1) (Jang *et al.*, 1996). El AP-1 está involucrado en la inducción del gen *PGHS-2* (Subbaramaiah *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2001), pero la interacción directa del AP-1 y el PGHS-2 no se había previamente descrito. Esta interacción origina la posibilidad, aun no estudiada, de que el PGHS-2 pueda ser transcripcionalmente activo como un heterodímero con el c-Fos. La proteína co-activadora p300 también se encontró que se compleja con el PGHS-2. Esto no fue sorprendente en razón a que el p300 tiene una actividad transacetilasa intrínseca que se ha mostrado como relevante para la transcripción del gen *PGHS-2* (Deng *et al.*, 2003). Finalmente, el PGHS-2 nuclear se unió a la proteína MDM2, así como también al promotor *MDM2*, aunque el significado de este hallazgo aun no es claro, existe la posibilidad de que, como el p53, el PGHS-2 se someta a la exportación nuclear y al cambio que está dirigido por el MDM2.

Ejemplos

Líneas celulares

La línea celular de cáncer de cabeza y cuello humano UM-SSC-22B se mantuvo en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS). Las células de cáncer de próstata humana DU145 se cultivaron en un medio esencial mínimo de Tagle suplementado con FBS al 10%. Las células endoteliales ECV 304 crecieron en un medio M199 que contenía 10% de FBS. Las células 293T crecieron a 60% de confluencia en DMEM con 5% de FBS. Todos los cultivos de célula se mantuvieron en una incubadora con 5% CO₂/95% O₂ a 37°C. Los reactivos de transducción de la señal utilizados en los tratamientos celulares incluyeron PD98059 y SB203580, obtenido de Calbiochem, La Jolla, CA, y PDTC y PMA obtenido de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.

Fraccionamiento celular

El fraccionamiento de las células en una microfuga y preparación de nucleoproteínas fue mediante un método previamente reportado (Lin *et al.*, 2002). Los extractos nucleares se prepararon mediante resuspensión del fraccionamiento nuclear crudo en un amortiguador alto en sal (420 mM de NaCl, 20% de glicerol) a 4°C con giro durante 1 hora. Los sobrenadantes fueron entonces recolectados después de la centrifugación subsecuente a 4°C y 13,000 rpm durante 10 min.

Inmunoprecipitación e inmunotransferencia

Las técnicas utilizadas fueron aquellas previamente descritas por nuestro laboratorio (Lin *et al.*, 1999). En resumen, las nucleoproteínas se separaron sobre SDS-PAGE discontinuo (geles 9%) y luego se transfirieron mediante electrotransferencia a membranas de Immobilon (Millipore, Bedford, MA). Después de bloquear con 5% de leche en una solución salina amortiguada con Tris que contiene 0.1% de Tween, las membranas se incubaron con varios anticuerpos durante toda la noche. Los anticuerpos secundarios fueron IgG anti-conejo de cabra (1:1000) o IgG anti-ratón de conejo (1:1000) (Dako, Carpintería, CA), dependiendo del origen del anticuerpo primario. Las proteínas inmunoreactivas se detectaron mediante quimioluminiscencia.

Transfección de plásmido y ensayo de luciferasa

Las células 293T fueron transectadas con plásmidos negativos dominantes, o con el vector dolo, utilizando Lipofectamina Plus (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las alícuotas de las células de cada grupo de tratamiento fueron entonces expuestas a las variables experimentales y posteriormente cosechadas para preparación de las proteínas nucleares. Un plasmado de control interno, la p-galactosidasa fue co-transfectado en todos los experimentos para normalización de los resultados.

Microscopia confocal

Las cedulas ECV 304, UM-SSC-22B y DU145 fueron cultivadas en cámaras deslizantes, fueron lavadas en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), fijadas mediante incubación durante 10 min en 2% de formaldehído en PBS y luego lavadas dos veces con PBS. Los anticuerpos monoclonales al PGHS-1, PGHS-2 (Cayman, Ann Arbor, MI) o c-Fos (Santa Cruz, Santa Cruz, CA) fueron diluidas en 1:200 en PBS, luego agregadas a la cámara y las muestras incubadas durante 45 min. Luego de lavar el PBS, las muestras se incubaron durante 30 min con una dilución 1:1000 de IgG anti-ratón de conejo conjugado con FITC en PBS. Un microscopio confocal de exploración Zeiss (510LS) con un láser de ion argón como fuente de excitación se utilizó para microscopia. Objetivos de 25X y 60X y una fuente de energía láser de 50% se utilizó para la localización subcelular de PGHS-1 y PGHS-2.

Transfección de los plásmidos negativos dominantes del MAPK (ERK1/2) y la quinasa p38

Los plásmidos que contienen fragmentos del promotor PGHS-2 humano fueron suministrados generosamente por el Dr. S. M. Prescott, Universidad de UTA, Salt Lake City, UT (Meade *et al.*, 1999). El plásmido -1800pGL2 contenía -1840/+ 123, y el plásmido +800pGL2 contenía la secuencia -831/+123. La galactosidasa pSV -f3- se utilizó como

un control de eficiencia de transfección. Los plásmidos negativos dominantes del MAPK (ERK1/2) fueron un regalo del Dr. Melanie Cobb (Universidad de Texas Southwestern, Dallas, TX). Utilizando lipofectamina plus, las células UM-SSC-22B confluentes 60% en placas de 10 cm fueron transfectadas con aproximadamente 6 µg de plásmidos del dominante negativo ERK1 y ERK2. Los cultivos fueron incubados a 37°C durante 5 h. El medio fue reemplazado con suero bovino fetal al 10% que contiene medio durante 24 h y luego con medio libre de suero durante 24 h. Las células transfectadas fueron incubadas con 100 nM de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, Sigma, St. Louis, MO) durante 12 h y posteriormente cosechadas para análisis western blot de los niveles de proteína PGHS-2.

10 Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

La inmunoprecipitación de la cromatina se efectuó como se describió por Luo *et al.* (1998) y Braunstein *et al.* (1996). Las alícuotas de las células (6×10^6) en monocapas fueron tratadas con 1% de formaldehído durante 15 min a temperatura ambiente para efectuar el reticulamiento. Las monocapas fueron entonces lavadas 2 veces con PBS. Los extractos fueron preparados mediante pelado de las células en 1 ml de amortiguador (150 mM NaCl, 1% NF - 40, 0.5% DOC, 0.1% SDS, 50 mM Tris {pH 8.0}, 5 mM EDTA) que contenían los inhibidores de proteasa leupeptina (10 µg/ml) y pepstatina A (10 µg/ml), los inhibidores de fosfatasa (50 mM de NaF y 0.2 mM de ortovanadato de sodio) y el inhibidor de acetilasa, trichostatin A, 5 µM (Calbiochem, San Diego, CA). Los lisados de célula fueron sonificados para producir fragmentos de cromatina de aproximadamente 600 bp, como se evaluó mediante la electroforesis del gen de agarosa. La inmunoprecipitación se llevó a cabo con un anti-p53 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA), antifosfoSer 392-p53 (Cell Signal-ing, Beverly, MA), o anti-acetilado p53 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). Para los estudios del promotor PGHS-2, se utilizó anti-PGHS-2 (Cayman). Los iniciadores utilizados en el PCR fueron los promotores del MDM2 [5'-GGATTGGGCCGGTTCAGTGG-3' (delantero) y 5'-GGTCTACCCTCCAATCGCCAC-3' (inverso)]; PGHS-2 [5'-CTGTTGAAAGCAACTTAGCT-3' (delantero) y 3'-AGACTGAAAACCAAGCCCAT-3' (inverso)]. Los resultados del PCR fueron resueltos mediante 1% de electroforesis de gel de agarosa, los genes fueron teñidos con bromuro de etidio. Los niveles relativos de ADN se determinaron con un software QuantifyOne (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA).

30 Ensayo de unión de ADN

Las alícuotas (200 µg) de proteínas de extracto nuclear que contienen 6 µg de las secuencias NF - κB, C/EBP, o CRE específicas de PGHS-2 biotinilado (Invitrogen) y 60 µl de glóbulos recubiertos con estreptavidina al 4% se incubaron durante una hora con agitación. Los glóbulos recubiertos con estreptavidina, con proteínas de extracto nuclear asociadas unidas a la sonda biotinilada, fueron paletizadas y lavadas tres veces con PBS frío. Las proteínas unidas a los glóbulos fueron eluidas mediante ebullición y se separaron sobre SDS-PAGE. El análisis western blot se llevó a cabo con un anticuerpo PGHS-2 antihumano como se describió anteriormente.

40 Referencias

- Arber, N., and DuBois, RN. (1999).** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and prevention of colorectal cancer. *Cuff Gastroenterol Rep* 1,441-448.
- Braunstein, M., Sobel, R.E., Allis, C.D., Turner, RM., and Broach, 1R (1996).** Efficient transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Mol Cell Biol* 16, 4349-4356.
- Cao, H.J., Wang, H.S., Zhang, Y., Lin, H.Y., Phipps, R.P., and Smith, T.J. (1998).** Activation of human orbital fibroblasts through CD40 engagement results in a dramatic induction of hyaluronan synthesis and prostaglandin endoperoxide H synthase-2 expression. Insights into potential pathogenic mechanisms of thyroid-associated ophthalmopathy. *J Biol Chem* 273, 29615-29625.
- Cao, H.J., and Smith, T.J. (1999).** Leukoregulin up-regulation of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 expression in human orbital fibroblasts. *Am J Physiol* 277, C1075-1085.
- Cao, H.J., Han, R., and Smith, T.J. (2003).** Robust induction of PGHS-2 by IL-1 in orbital fibroblasts results from low levels of IL-1 receptor antagonist expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 284, C1429-1437.
- Carey, T.E., Kimmel, K.A., Schwartz, D.R., Richter, D.E., Baker, S.R., and Krause, C.J. (1983).** Antibodies to human squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head and Neck Surg* 91, 482-491.
- Davies, G.L. (2003).** Cyclooxygenase-2 and chemoprevention of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86, 495-499.
- Davies, G., Martin, L.A., Sacks, N., and Dowsett, M. (2002).** Cyclooxygenase-2 (COX-2), aromatase and breast cancer: a possible role for COX-2 inhibitors in breast cancer chemoprevention. *Ann Onco* 113, 669-678.

Deng, W.G., Zhu, Y, and Wu, K.K. (2004). Role of p300 and PCAF in regulating cyclooxygenase-2 promoter activation by inflammatory mediators. *Blood* 103, 2135-2142.

Funk, C.D., Funk, L.B., Kennedy, M.E., Pong, AS., and Fitzgerald, G.A. (1991). Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin GIH synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J* 5, 2304-2312.

Gately, S., and Li, W.W. (2004). Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. *Semin Onco* 131, 2-11.

Goppelt-Strube, M., Rehm, M., and Schaefer, H.J. (2000). Induction of cyclooxygenase-2 by platelet-derived growth factor (PDGF) and its inhibition by dexamethasone are independent of NF-kappaB/IkappaB transcription factors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 361, 636-645.

Guo, Y.S., Hellmich, M.R., Wen, X.D., and Townsend, C.M., Jr. (2001). Activator protein-1 transcription factor mediates bombesin-stimulated cyclooxygenase-2 expression in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 276,22941-22947.

Habib, A, Martinuzzo, M.B., Carreras, L.a., Levy-Toledano, S., and Maclof, J. (1995). Increased expression of inducible cyclooxygenase-2 in human endothelial cells by antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* 74, 770-777.

Han, R., Tsui, S., and Smith, T.J. (2002). Up-regulation of prostaglandin E2 synthesis by interleukin-1 beta in human orbital fibroblasts involves coordinate induction of prostaglandinendoperoxide H synthase 2 and glutathione-dependent prostaglandin E2 synthase expression. *J Biol Chem* 277, 16355-16364.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hendrickx, N., Volanti, C., Moens, u., Setemes, a.M, de Witte, P., Vandenheede, J.R., Piette, J., and Agostinis, P. (2003). Up-regulation of cyclooxygenase 2 and apoptosis resistance by p38 MAPK in hypericin-mediated photodynamic therapy of human cancer cells. *J Biol Chem* 278, 52231-52239.

Hoshino, T., Tsutsumi, S., Tomisato, W., Hwang, H.J., Tsuchiya, T., and Mizushima, T. (2003). Prostaglandin E2 protects gastric mucosal cells from apoptosis via EP2 and EP4 receptor activation. *J Biol Chem* 278, 12752-12758.

Howe, L.R., Subbaramaiah, K., Brown, AM., and Dannenberg, A.J. (2001). Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 8,97-114.

Ishaque, A., Dunn, M.J., and Sorokin, A (2003). Cyclooxygenase-2 inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in renal glomerular mesangial cells. *J Biol Chem* 278, 10629-10640.

Jang, S.L, Steinert, P.M., and Markova, N.G. (1996). Activator protein 1 activity is involved in the regulation of the cell type-specific expression from the proximal promoter of the human profilaggrin gene. *J Biol Chem* 271, 24105-24114.

Kujubu, D.A, Reddy, S.T., Fletcher, B.S., and Herschman, H.R. (1993). Expression of the protein product of the prostaglandin synthase-2/TIS 10 gene in mitogen-stimulated Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 268, 5425-5430.

Lim, J.W., Kim, H., and Kim, K.H. (2002). Expression of Ku70 and Ku80 mediated by NF-kappa B and cyclooxygenase-2 is related to proliferation of human gastric cancer cells. *J Biol Chem* 277,46093-46100.

Lin, R.Y., Davis, F.B., Gordinier, J.K., Martino, L.J., and Davis, P.J. (1999). Thyroid hormone induces activation of mitogen-activated protein kinase in cultured cells. *Am J Physiol* 276, C1014-1024.

Lin, H.Y., Shih, A., Davis, F.B., Tang, R.Y., Martino, L.J., Bennett, J.A., and Davis, P.J. (2002). Resveratrol induced serine phosphorylation of p53 causes apoptosis in a mutant p53 prostate cancer cell line. *J Urol* 168, 748-755.

Liou, J.Y., Deng, W.G., Gilroy, D.W., Shyue, S.K., and Wu, K.K. (2001). Colocalization and interaction of cyclooxygenase-2 with caveolin-1 in human fibroblasts. *J Biol Chem* 276, 34975-34982.

Luo, R.x., Postigo, A.A., and Dean, D.C. (1998). Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* 92, 463-473.

Marvin, K.W., Eykholt, R.L., and Mitchell, M.D. (2000). Subcellular localization of prostaglandin synthase-2 in a human amnion cell line: implications for nuclear localized prostaglandin signaling pathways. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 62, 7-11.

- Meade E.A., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., and Prescott, S.M. (1999). Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem* 274,8328-8334.
- Molina-Rolgado, E., Ortiz, S., Molina-Rolgado, F., and Guaza, C. (2000). Induction of COX-2 and PGE (2) biosynthesis by IL-1 beta is mediated by PKC and mitogen-activated protein kinases in murine as- trocytes. *Br J Pharmacol* 131, 152-159.
- Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D., and Levine, AJ. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69, 1237-1245.
- Moran, E.M. (2002). Epidemiological and clinical aspects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer risks. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 21, 193-201.
- Morita, I., Smith, W.L., DeWitt, D.L., and Schindler, M. (1995). Expression-activity profiles of cells transfected with prostaglandin endoperoxide H synthase measured by quantitative fluorescence microscopy. *Biochemistry* 34, 7194-7199.
- Oshima, M., Dinchuk, J.E., Kargman, S.L., Oshima, H., Hancock, B., Kwong, E., Trzaskos, J.M., Evans, J.F., and Taketo, M.M. (1996). Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 87, 803-809.
- Pai, R., Soreghan, B., Szabo, I.L., Pavelka, M., Baatar, D., and Tamawski, AS. (2002). Prostaglandin E2 trans activates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med* 8, 289-293.
- Pang, L., Nie, M., Corbett, L., Donnelly, R., Gray, S., and Knox, AJ. (2002). Protein kinase C-epsilon mediates bradykinin-induced cyclooxygenase-2 expression in human airway smooth muscle cells. *Faseb J* 16, 1435-1437.
- Parfenova, H., Parfenov, V.N., Shlopov, B.V., Levine, V., Falkos, S., Pourcyrous, M., and Leffler, C.W. (2001). Dynamics of nuclear localization sites for COX-2 in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C166-178.
- Patel, V.A., Dunn, M.J., and Sorokin, A (2002). Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 277,38915-38920.
- Piazuelo, E., Jimenez, P., and Lanasa, A (2003). COX-2 inhibition in esophagitis, Barrett's esophagus and esophageal cancer. *Curr Pharm Des* 9, 2267-228024.
- Robbins, D.J., Zhen, E., Owaki H., Vanderbilt, C.A., Ebert, D., Geppert, T.D., and Cobb, M.H. (1993). Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 *in vitro*. *J Biol Chem* 268,5097-5106.
- Rollins, T.E., and Smith, W.L. (1980). Subcellular localization of prostaglandin-forming cyclooxygenase in Swiss mouse 3T3 fibroblasts by electron microscopic immunocytochemistry. *J Biol Chem* 255, 4872-4875.
- Smith, W.L., Rollins, T.E., and DeWitt, D.L. (1981). Subcellular localization of prostaglandin forming enzymes using conventional and monoclonal antibodies. *Prog Lipid Res* 20, 103-110.
- Smith, W.L., Garavito, R.M., and DeWitt, D.L. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 271, 33157-33160.2.
- Smith, W.L., and Dewitt, D.L. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Adv Immuno* 162, 167-215.
- Smith, W.L., DeWitt, D.L., and Garavito, R.M. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69, 145-182.
- Subbaramaiah, K., Norton, L., Gerald, W., and Dannenberg, A.J. (2002). Cyclooxygenase-2 is overexpressed in HER-2/neu-positive breast cancer: evidence for involvement of AP-1 and PEA3. *J Biol Chem* 277, 18649-18657.
- Wang, D., and Dubois, R.N. (2004). Cyclooxygenase-2: a potential target in breast cancer. *Semin Oncol* 31 (1 Supp13), 64-73.
- Wang, Z., and Tai, H.H. (1998). Interleukin-1 beta and dexamethasone regulate gene expression of prostaglandin H synthase-2 via the NF- κ B pathway in human amnion derived WISH cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 59, 63-69.
- Wulfig, C., Eltze, E., von Struensee, D., Wulfig, P., Hertle, L., and Piechota, H. (2004). Cyclooxygenase-2 expression in-bladder cancer: correlation with poor outcome after chemotherapy. *Eur Urol* 45, 46-52.

Xiong, B., Sun, T.J., Yuan, H.Y., Hu, M.B., Hu, W.D., and Cheng, F.L. (2003). Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 9, 1237-1240.

Xu, X.M., Ohashi, K., Sanduja, S.K., Ruan, K.R., Wang, L.H., and Wu, K.K. (1993). Enhanced prostacyclin synthesis in endothelial cells by retrovirus-mediated transfer of prostaglandin H synthase cDNA *J Clin Invest* 91, 1843-1849.

Yoshimura, R., Sano, H., Masuda, c., Kawamura, M., Tsubouchi, Y., Chargui, J., Yoshimura, N., Hla, T., and Wada, S. (2000). Expression of cyclooxygenase-2 in prostate carcinoma. *Cancer* 89, 589-596.

Yu, H.P., Xu, S.Q., Liu, L., Shi, L.Y., Cai, X.K., Lu, W.H., Lu, B., Su, Y.H., and Li, Y.Y. (2003). Cyclooxygenase-2 expression in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer Lett* 198, 193-201.

Zhu, Y., Saunders, M.A., Yeh, H., Deng, W.G., and Wu, K.K. (2002). Dynamic regulation of cyclooxygenase-2 promoter activity by isoforms of CCAAT/enhancer-binding proteins. *J Biol Chem* 277, 6923-6928.

Zhuang, Z.H., Wang, L.D., Tsao, S.W., Cheung, L.M., Feng, H.C., Yang, T., Qin, Y.R., Wang, C.D., Chen, Z.Z., and Liu, B. (2003). [Cyclooxygenase-2 expression in esophageal cancer cells and induction by mitomycin C]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 42, 701-704.

Zimmermann, K.C., Sarbia, M., Weber, A.A., Borchard, F., Gabbert, H.E., and Schror, K. (1999). Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 59, 198-204.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para identificar inhibidores de actividad de transactivación de PGHS-2, en donde el método comprende las etapas:
- a) poner en contacto una sonda de ácido nucleico que corresponde a por lo menos una región del *PGHS-2* o el promotor *MDM2* con la proteína PGHS-2 en la presencia y ausencia de un compuesto de prueba;
- 10 b) determinar el nivel de unión de la proteína PGHS-2 a la sonda; en donde una disminución en la cantidad de la proteína unida en la presencia de dicho compuesto de prueba comparado con la cantidad de la proteína unida en la ausencia de dicho compuesto de prueba indica que el compuesto es un inhibidor de la actividad de transactivación de PGHS-2.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en donde el nivel de unión se determina mediante un ensayo de unión de ADN-proteína.
3. El método de la reivindicación 2, en donde dicho ensayo de unión de ADN-proteína es un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina.
- 20 4. El método de la reivindicación 2, en donde dicho ensayo de nivel de ADN es un ensayo de cambio de movilidad electroforético.
5. El método de la reivindicación 2 en donde la por lo menos una región del promotor *PGHS-2* se selecciona del grupo que consiste del sitio c/EBP, un sitio CRE y un sitio NF - κ B.
- 25 6. El método de la reivindicación 1, en donde dicha sonda está marcada.
7. El método de la reivindicación 1 en donde dicha sonda es biotinilada.
- 30 8. El método de selección de los compuestos de prueba para identificar los inhibidores de la transactivación de PGHS-2, en donde los métodos comprenden las etapas:
- a) suministrar una célula que produce constitutivamente PGHS-2, en donde la dicha célula se ha transfectado con un primer ácido nucleico que corresponde a una región del promotor *PGHS-2* y a un segundo ácido nucleico que codifica una molécula reportera;
- 35 b) exponer dicha célula a dicho compuesto de prueba;
- c) aislar un extracto nuclear de dichas células;
- 40 d) comparar el nivel de la molécula reportera en dicho extracto con el nivel de la molécula reportera en un extracto nuclear de las células no expuestas, en donde una disminución del nivel de la molécula reportera es indicativa de la inhibición de la transactivación del PGHS-2.
- 45

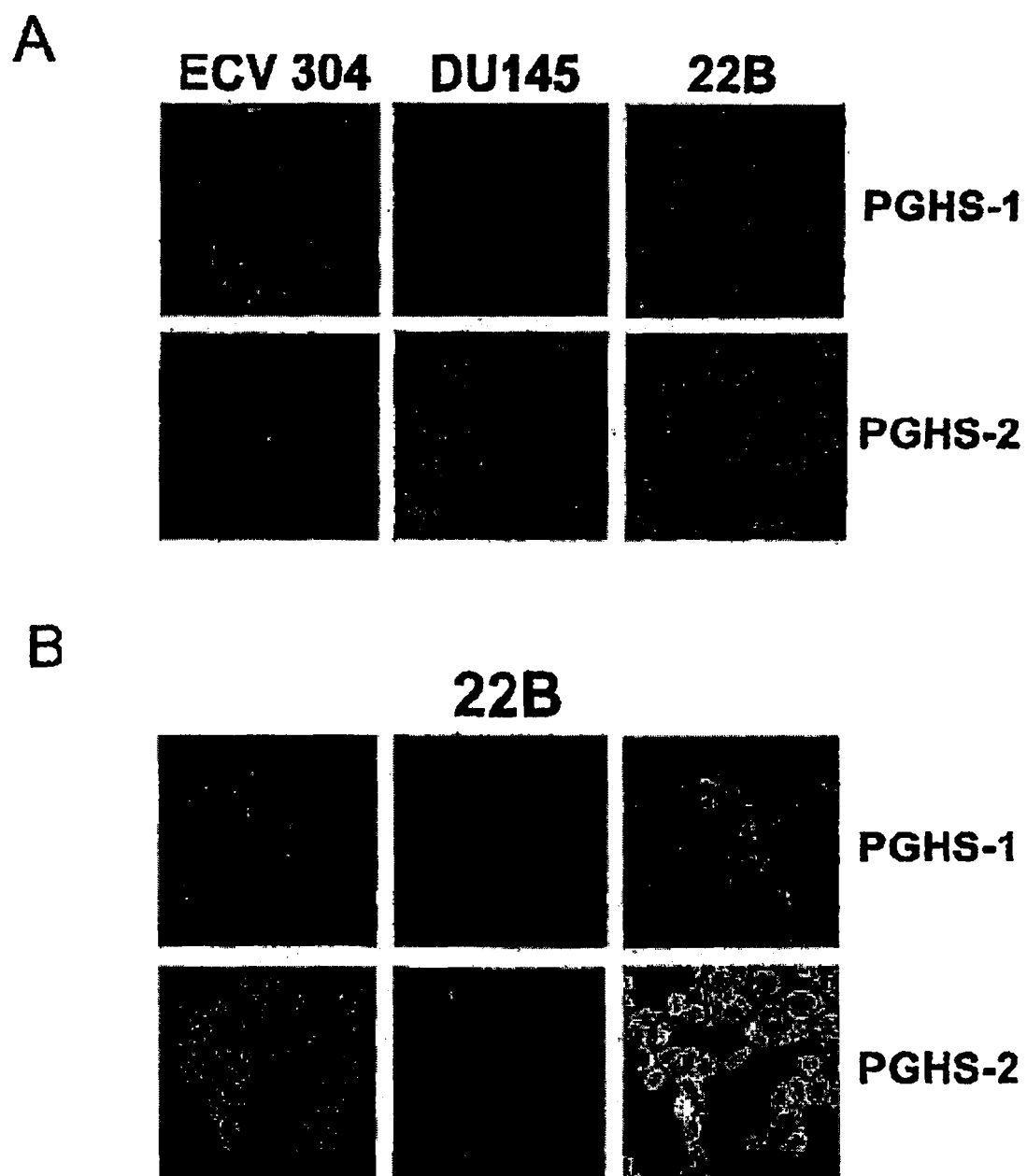
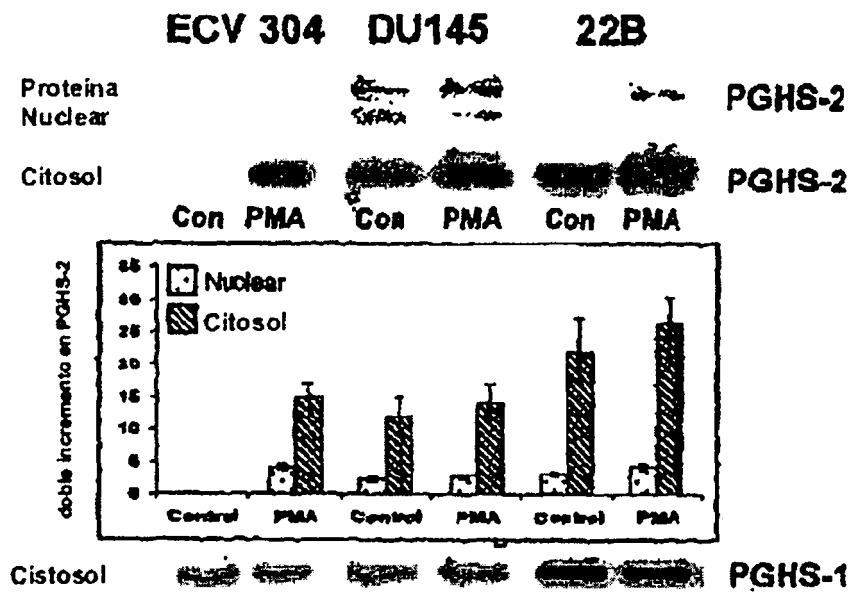


FIGURA 1

A



B

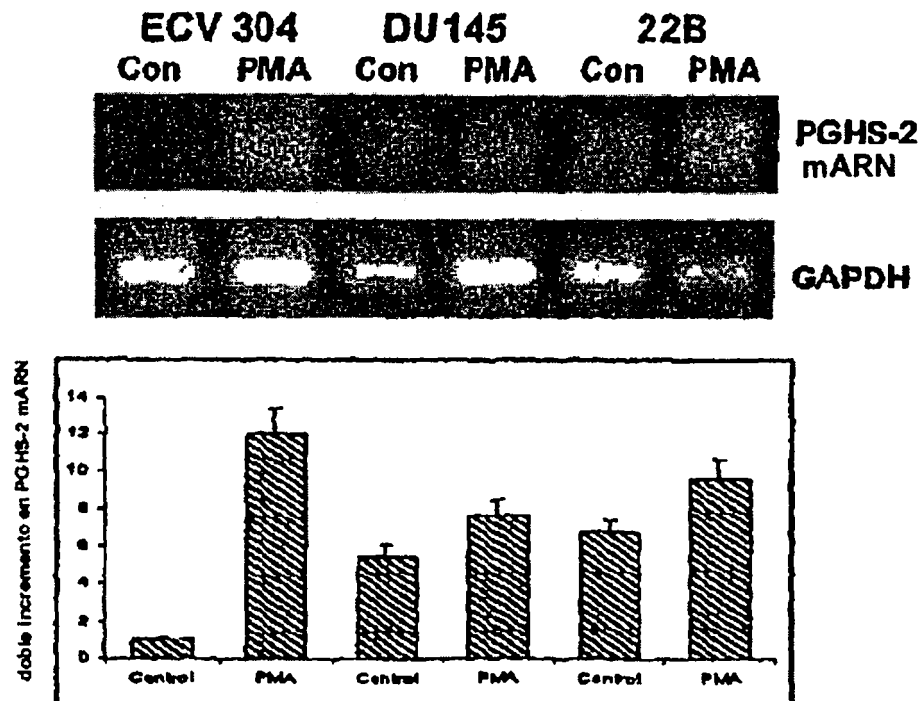


FIGURA 2

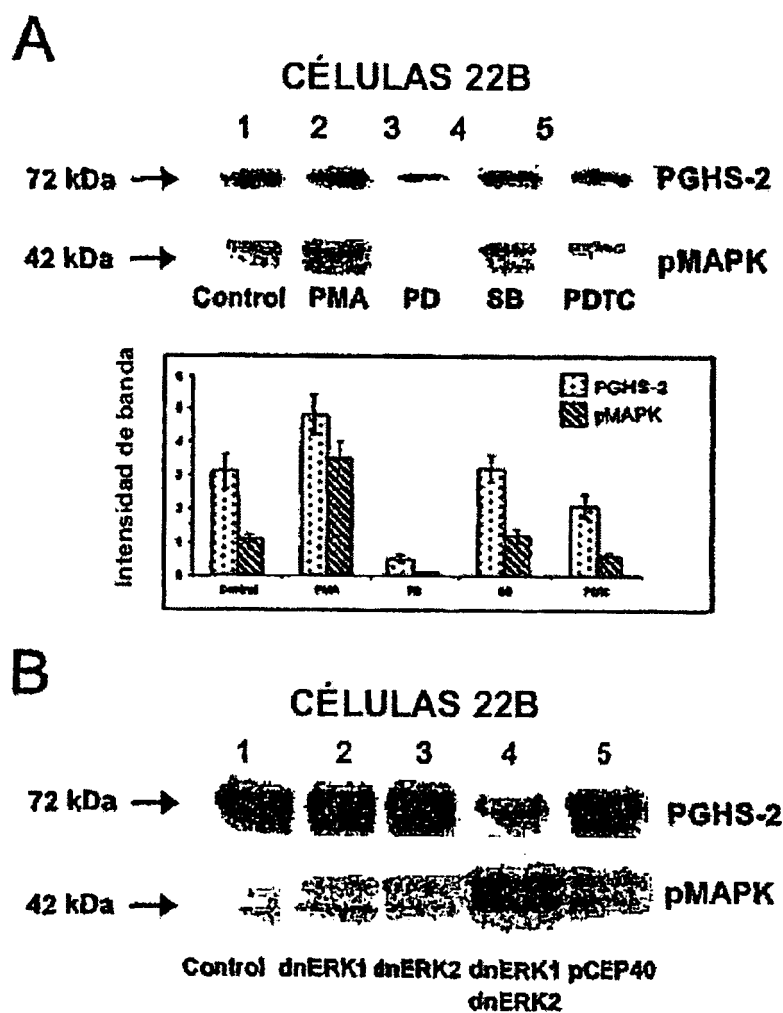


FIGURA 3

Niveles PGE₂ en células ECV304, DU145 22B

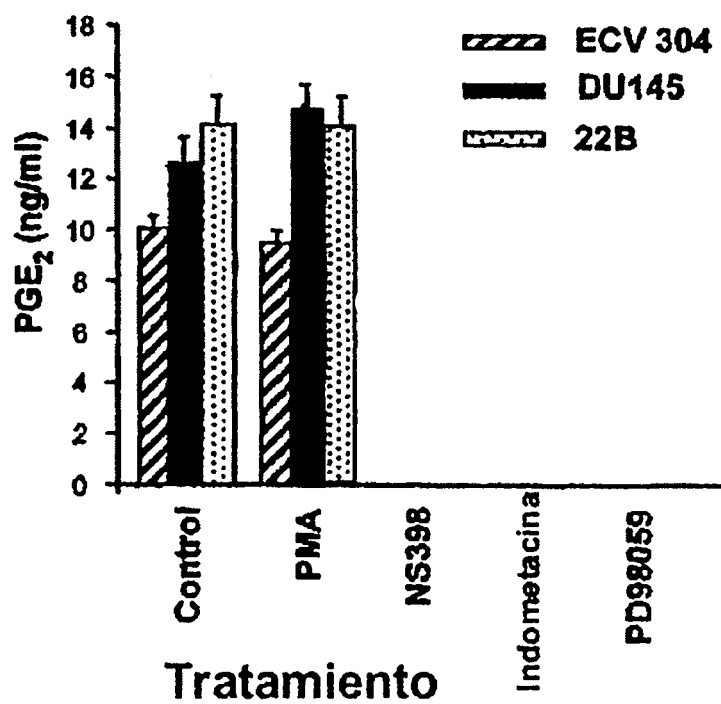


FIGURA 4

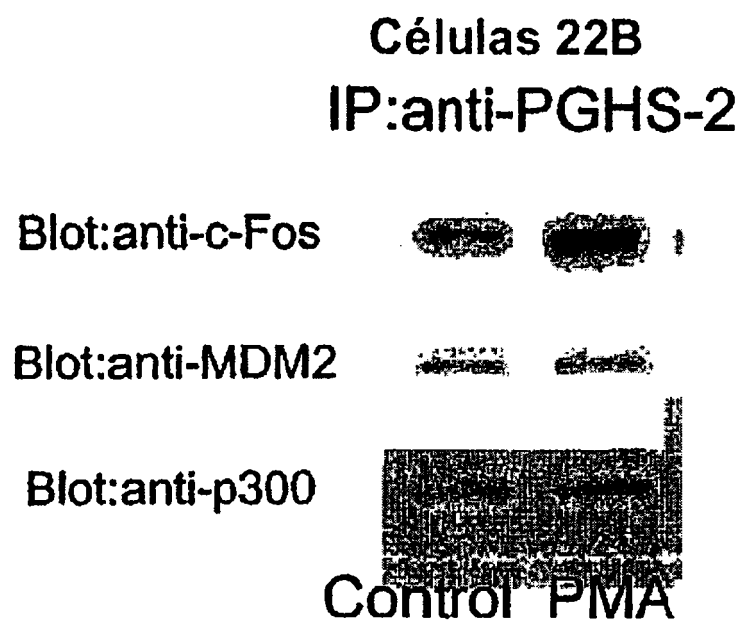


FIGURA 5

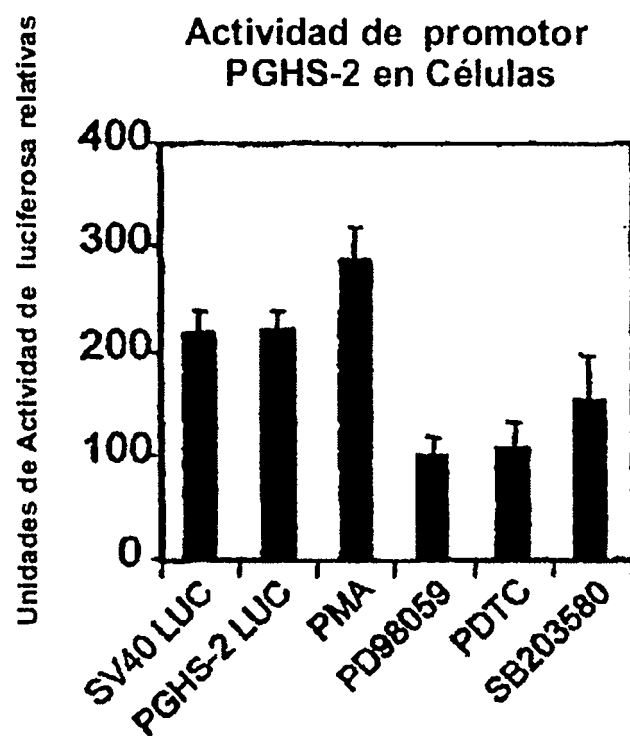


FIGURA 6

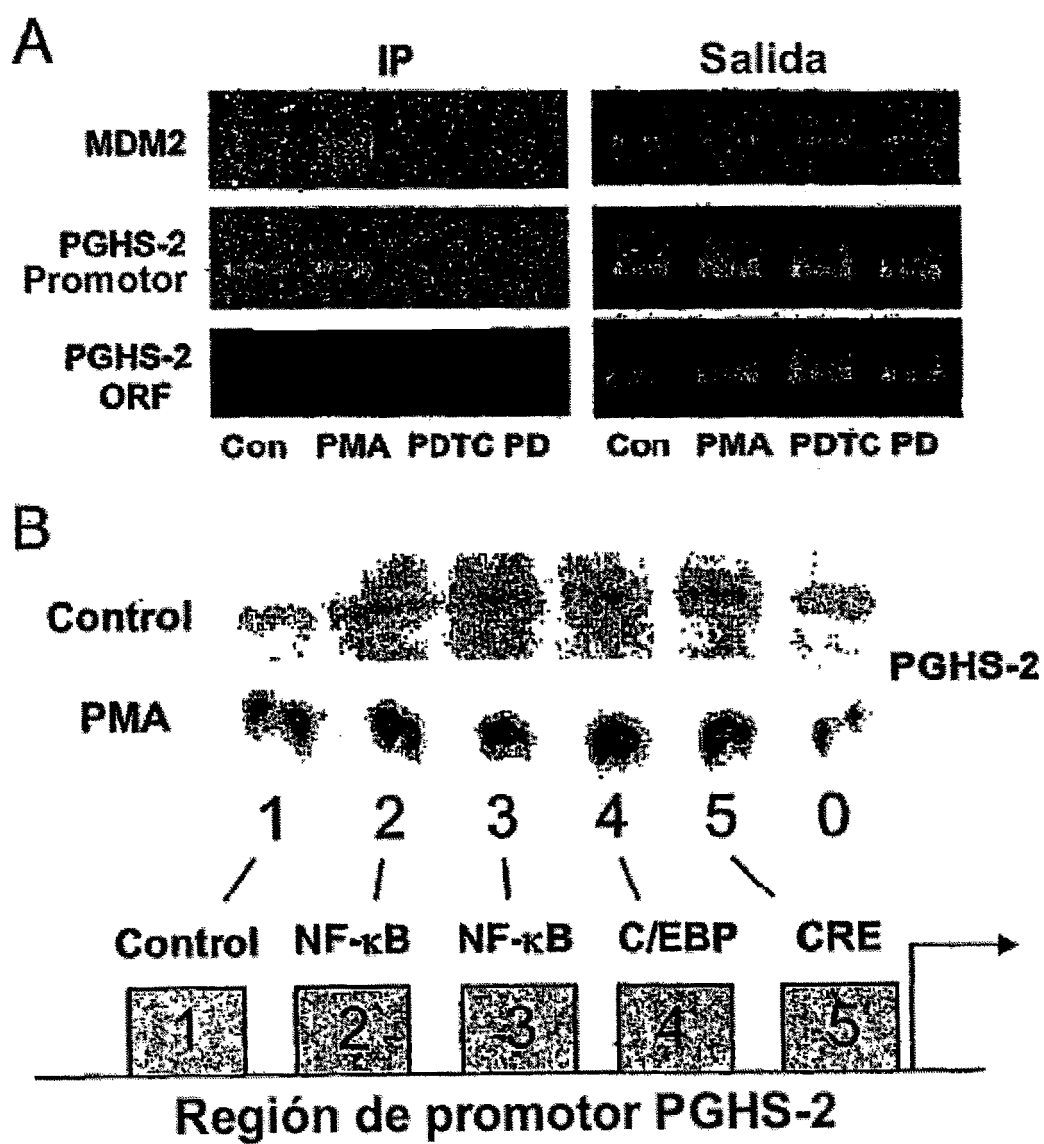


FIGURA 7

Actividad de promotor PGHS-2

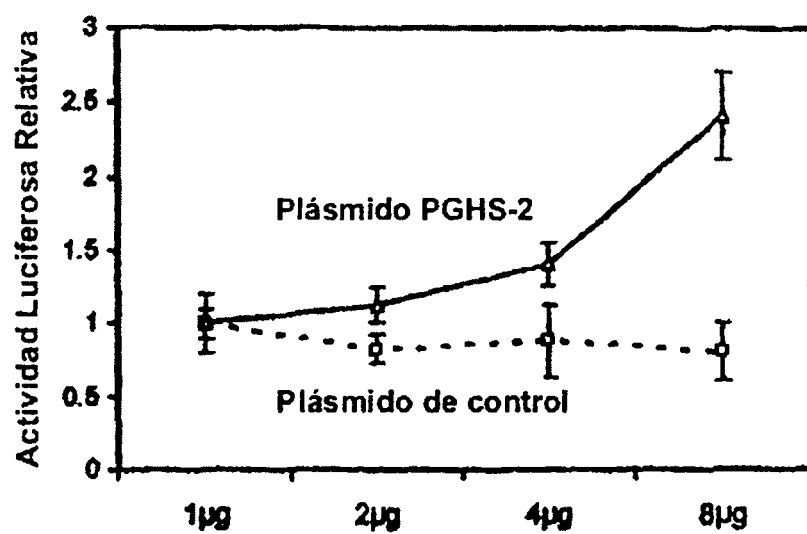


FIGURA 8