

**IDENTIFICACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN
LA ADQUISICIÓN DEL FENOTIPO METASTÁSICO
EN MODELOS EXPERIMENTALES DE CÁNCER DE MAMA**

Memoria elaborada por

Pedro Alía Ramos

Para optar al grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. Àngels Fabra Fres, en el Institut de Recerca Oncològica (IRO) de la Ciudad Sanitaria y Universitaria de Bellvitge, y adscrita al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Barcelona

Tutora: Dra. Anna Bassols Teixidó

Barcelona, enero de 2004

A mis padres y hermanos

A Begoña y a Julia

Ningún trabajo científico es obra de una sola persona. Ni siquiera el que se considere más individual, original o independiente.

Este trabajo se debe sobre todo a la entrega, el entusiasmo y el desinterés de un grupo de personas, cuyo vínculo es antiguo y amistoso. Por eso, para empezar, me gustaría destacar el ambiente amable y familiar en que todo se generó. Mi trabajo habría sido imposible (y de hecho insostenible) de no haberme sentido arropado, valorado y querido por el grupo, de no haberme sentido, en definitiva, como en casa.

Quisiera agradecer a Angels Fabra, primero, que se haya comportado conmigo en todo momento como una hermana mayor, consejera, protectora y paciente, y segundo, que se haya dejado la piel como alma impulsora de todo el trabajo, el motor de arranque y la sumaria aglutinadora.

También quisiera agradecer a Antonia Vinyals, ante todo, su calidad de hermana cómplice; pero también su vitalidad arrolladora, su dedicación, su consejo prudente, su maestría y su paciencia al enseñarme casi todo lo que sé de la práctica de la biología molecular.

Gracias también a Ana Llorens, mi abnegada hermana de fatigas, orientadora de mis primeros pasos entre geles y membranas, con quien he compartido tantas horas de gracias y desgracias, por su apoyo constante y su alegre entrega.

Gracias a Milagro González, por su maternal optimismo y su oído siempre atento a cualquier necesidad, por su permanente trabajo en la sombra.

Gracias a Marc Adrover, el hermano menor de la familia, por ser muchas veces mi otro par de manos y mi otro par de ojos; por hacerme de alumno con paciencia y enseñarme a enseñar.

Gracias a Bo Shi, el hermano exótico adoptado, por su inagotable y estimulante curiosidad y su chinísima eterna sonrisa.

Han pasado quizá demasiados años desde que todo empezó, y no quisiera dejarme a ninguno de los otros miembros que, aunque no tan directamente, también me ayudaron con sus ideas (a veces con su ingenio), su capacidad de discusión, su disponibilidad o su simple presencia (siempre tan valiosa, sobre todo a las horas intempestivas habituales en los laboratorios). Luengos años, lista luenga, así que, sin preferencias, muchas gracias también a Miguel Ángel, Rosa, Silvia, Maite, Luis, Rosana, Gemma, Laia, Jordi, Blanca, Sandra, Laura, Olga, Yolanda, Angels, Agnès, Pablo y Mireia.

Espero haber correspondido a todos con un poco de buena voluntad y otro poco de buena compañía. Lo he pasado muy bien junto a ellos, y lo sigo pasando cuando puedo. Que sepan que por mucho que sea el espacio o el tiempo que nos llegue a separar, serán siempre mi otra familia.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS UTILIZADOS

A : amperio / adenina

ADAMTS1: *a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1*

Anti:- este prefijo, antepuesto al nombre de un gen, designa un RNA antisentido en el presente trabajo.

bcas2: *breast carcinoma amplified sequence 2*

C: citosina

CHL1: *close homolog to L1CAM*

CPM: cuentas por minuto

dam1: *DNA amplified in mammary carcinoma*

(d)ATP: trifosfato de (desoxi)adenosina

(d)CTP: trifosfato de (desoxi)citidina

(d)GTP: trifosfato de (desoxi)guanosina

(d)TTP: trifosfato de (desoxi)timidina

dNTP: trifosfodesoxirribonucleótidos

DEPC: pirocarbonato de dietilo

DLB: (*denaturing loading buffer*) solución desnaturalizante para carga de geles

DMEM: *Dulbecco's modified eagle medium*

DMSO: sulfóxido de dimetilo

DNA: ácido desoxirribonucleico

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilen-diamino-tetraacético

eEF-1 α : factor de elongación (eucariotas) 1 α

EPLIN: *epithelial protein lost in neoplasm*

ESDN: *endothelial and smooth muscle cell-derived neuropilin-like protein*

G: guanina

HLA: (*human lymphocyte antigen*) antígeno linfocitario humano

i.m.f.p.: (intramammary fat pad) panículo adiposo de la mama

IPTG: isopropilo- β -D-tiogalactósido

LB: medio de cultivo de Luria-Bertani / solución para carga de geles (*loading buffer*)

MHC: (*major histocompatibility complex*) complejo principal de histocompatibilidad

MOPS: ácido 3-[*N*-morfolino]propanosulfónico

M-MuLV: (*Moloney mouse leukemia virus*) virus de la leucemia murina de Moloney

Nono: *non-POU domain-containing octamer-binding protein*

oligo(dT): ácido oligodesoxitimídico

PBS: (*phosphate-buffered saline*)

PCR: (*polymerase chain reaction*) reacción en cadena de la polimerasa

RAMP2: *receptor activity modifying protein 2*

RAP-PCR: *RNA arbitrarily primed-PCR*

RBP: *ribosome-binding protein*

RNA: ácido ribonucleico

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

rRNA: ácido ribonucleico ribosómico

RNAsa: ribonucleasa

RT-PCR: transcripción inversa – reacción en cadena de la polimerasa

SCID: (*severe combined immunodeficiency*) inmunodeficiencia combinada grave
(alinfocitosis: ausencia de linfocitos B y T)

SDS: dodecilsulfato sódico

SLAP3: *sarcolemmal-associated protein 3 (Oryctolagus cuniculus)*

Slmap: *sarcolemmal-associated protein (Mus musculus)*

SSC: (sodium salt citrate) solución de cloruro y citrato sódicos

STE: (sodium-Tris-EDTA) solución de cloruro sódico, Tris y EDTA

Stlp: *signal transducer and activator of transcription interacting protein* o **Stat-3**
interacting protein.

T: timina

TAE: solución de Tris-acetato-EDTA

tbc1d1: *tre-2/USP6, BUB2, cdc16 domain family, member 1*

TBE: solución de Tris-borato-EDTA

TE: solución de Tris-EDTA

U: unidad enzimática

UV: ultravioleta

V : voltio

W : vatio

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido

7MXT: nombre arbitrario de uno de los fragmentos de cDNA identificados en este trabajo.

SUMARIO

1.- INTRODUCCIÓN	13
1.1.- EL CÁNCER DE MAMA	15
1.2.- EL PROCESO METASTÁSICO.....	21
1.3.- MODELOS EXPERIMENTALES DE CÁNCER DE MAMA METASTASICO ...	23
1.4 .- DETECCIÓN DE GENES ASOCIADOS AL FENOTIPO METASTASICO	27
1.5.- MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS ASOCIADOS AL FENOTIPO METASTÁSICO	30
1.6.- PERSPECTIVA FUTURA.....	42
HIPÓTESIS.....	43
2.- DETECCIÓN, MEDIANTE RAP-PCR, DE GENES CANDIDATOS A PARTICIPAR EN EL PROCESO METASTÁSICO DEL CARCINOMA MAMARIO	45
2.1.- MATERIAL Y MÉTODOS	47
2.1.1.- Descripción de los modelos celulares.....	47
2.1.2.- Cultivo de las células: condiciones de crecimiento y recogida de <i>pellets</i> ..	48
2.1.3.- Obtención de mRNA.	49
2.1.4.- RNA Arbitrarily Primed (RAP)-PCR.	50
2.1.4.1.- Transcripción inversa.	50
2.1.4.2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	51
2.1.5.- Electroforesis en gel de secuenciación.....	53
2.1.6.- Clonación de los fragmentos de cDNA reamplificados.	54
2.1.7.- Secuenciación de los cDNAs	55
2.1.8.- Hibridación en ranura (<i>slot blot</i>).....	57
2.1.8.1.- Transferencia del mRNA a membranas	57
2.1.8.2.- Obtención de sondas y marcaje radiactivo.....	58
2.1.8.3.- Condiciones de la hibridación y lavados.	59
2.1.9.- Hibridación Northern	60
2.1.9.1.- Separación electroforética del mRNA	60
2.1.9.2.- Transferencia del mRNA a una membrana	60
2.1.9.3.- Obtención de sondas y marcaje radiactivo.....	60
2.1.9.4.- Condiciones de la hibridación y lavados	60
2.1.10.- Preparación de una genoteca de cDNA (Stratagene).....	60
2.1.11.- Cribado de la genoteca de cDNA.....	65
2.1.11.1.- Preparación de placas con virus	65
2.1.11.2.- Transferencia de los virus a membranas	66
2.1.11.3.- Obtención de sondas y marcaje radiactivo.....	66
2.1.11.4.- Condiciones de la hibridación y lavados	66

2.1.11.5.- Reconocimiento y aislamiento de virus seleccionados.....	66
2.1.11.6.- Obtención de bacterias con el fásmido.....	67
2.1.11.7.- Obtención de los fásmidos.....	67
2.2.- RESULTADOS	69
2.2.1.- Prospección de la expresión génica diferencial en variantes metastásicas por RAP-PCR.....	69
2.2.1.1.- Variantes de distinta capacidad metastásica (modelo MXT).....	70
2.2.1.2: Variantes de distinta organoespecificidad de las metástasis (RAP MDA-MB 435).....	74
2.2.2.- Estudio en poblaciones metastásicas de la expresión diferencial de genes localizados por RAP-PCR.....	78
2.2.2.1.- En el modelo MXT.....	78
2.2.2.2.- En el modelo MDA-MB 435.....	80
2.2.3.- Identificación de genes, localizados por RAP-PCR, que se expresan diferencialmente en células con distinta capacidad metastásica.....	84
2.2.4.- “Caracterización” del gen 7MXT.....	89
2.2.4.1.- Estudio de la expresión de 7MXT en diferentes órganos.....	89
2.2.4.2.- Cribado de una genoteca de cDNA (del clon S15) con la sonda 7MXT.....	91
2.2.5.- Nuevos genes candidatos asociados al fenotipo metastásico.....	96
3.- ESTUDIO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE LA INFLUENCIA DE ADAMTS1 SOBRE CARACTERÍSTICAS ASOCIADAS AL FENOTIPO METASTÁSICO.....	99
3.1.- INTRODUCCIÓN.....	101
3.2.- MATERIAL Y MÉTODOS	102
3.2.1.- Cribado de la genoteca de cDNA de S15 con sondas de ADAMTS1.....	102
3.2.2.- Secuenciación de ADAMTS1.....	104
3.2.3.- Preparación de construcciones anti-ADAMTS1.....	104
3.2.3.1- Clonación en vectores pCR-SK(-).....	104
3.2.3.2.- Clonación en el vector pZeoSV2(+)......	106
3.2.4.- Transfección estable del clon B2 con ADAMTS1 antisentido.....	108
3.2.4.1.- Condiciones de cultivo.....	108
3.2.4.2.- Condiciones de la transfección.....	108
3.2.4.3.- Comprobación del éxito de la transfección.....	109
3.2.5.- Valoración de la expresión de ADAMTS1 en los clones transfectados seleccionados.....	112
3.2.5.1- Obtención de RNA (total).....	112
3.2.5.2.- Obtención de RNA poliA a partir de RNA total.....	113
3.2.5.3.- Hibridación Northern.....	113

3.2.6.- Efecto de la expresión de ADAMTS1 sobre la adhesión <i>in vitro</i> de las células al sustrato.....	113
3.2.7.- Efecto de la expresión de ADAMTS1 sobre la capacidad migratoria <i>in vitro</i>	115
3.2.8.- Efecto de la expresión de ADAMTS1 sobre la capacidad tumorigénica y metastásica <i>in vivo</i>	116
3.3.- RESULTADOS	118
3.3.1.- Obtención del cDNA completo de ADAMTS1	118
3.3.1.1.- Cribado de la genoteca S15 con sondas ADAMTS1.....	120
3.3.1.2.- Secuenciación de los insertos seleccionados	122
3.3.2.- Transfección del cDNA de ADAMTS1 en células de distinta capacidad metastásica.	122
3.3.2.1.- Preparación de la construcción en antisentido.....	122
3.3.2.2.- Transfección de anti-ADAMTS1 en células B2	125
3.3.3.- Cambios en la capacidad adhesiva <i>in vitro</i> de las células transfectadas	128
3.3.4.- Cambios en la capacidad migratoria <i>in vitro</i> de las células transfectadas	133
3.3.5.- Cambios en la capacidad tumorigénica y metastásica <i>in vivo</i> de las células transfectadas	134
4.- ESTUDIO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE LA INFLUENCIA DE CIITA SOBRE CARACTERÍSTICAS ASOCIADAS AL FENOTIPO METASTÁSICO	135
INTRODUCCIÓN	137
4.1.- MATERIAL Y MÉTODOS	137
4.1.1.- Condiciones de los cultivos celulares.	137
4.1.2.- Preparación de transfecciones estables.	138
4.1.3.- Pruebas de tumorigenicidad y metástasis espontáneas.....	138
4.2.- RESULTADOS	139
5.- DISCUSIÓN	143
5.1.- DETECCIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL FENOTIPO METASTÁSICO MEDIANTE RAP-PCR.....	147
5.2.- IDENTIFICACIÓN DE GENES POSIBLEMENTE ASOCIADOS AL FENOTIPO METASTÁSICO	152
Expresión en variantes metastásicas	153
5.3.- CARACTERÍSTICAS DE LOS GENES IDENTIFICADOS Y SU POSIBLE RELACIÓN CON EL FENOTIPO METASTÁSICO	157
5.4.- ESTUDIO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE LAS CARACTERÍSTICAS INVASIVAS Y METASTÁSICAS CONFERIDAS POR ADAMTS1	173
5.6.- ESTUDIO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DE LAS CARACTERÍSTICAS INVASIVAS Y METASTÁSICAS CONFERIDAS POR CIITA.....	176

6.- CONCLUSIONES.....	179
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	183

1.- INTRODUCCIÓN

1.1- EL CÁNCER DE MAMA

Aspectos epidemiológicos

El cáncer de mama es una de las enfermedades más frecuentes entre las mujeres de los países desarrollados. Por ejemplo, en Europa, considerando una probabilidad de vida de 85 años, se estima que una de cada nueve mujeres padecerá esta enfermedad a lo largo de su vida. Conviene añadir que el cáncer de mama es la causa más frecuente de muerte en el grupo de edad de 35 a 50 años, y que el número de casos entre las mujeres de menos de 40 años va en aumento (1).

Existen diferencias en cuanto a la incidencia de la enfermedad según las regiones y según los hábitos y conductas de la población, lo que permite suponer que en el desarrollo de la enfermedad influyen tanto factores genéticos como ambientales.

Los factores de riesgo más conocidos son la menarquia precoz, la edad avanzada en el momento del primer parto, el retraso de la menopausia y los antecedentes de tumores benignos. La exposición a radiaciones ionizantes puede también aumentar ligeramente el riesgo de sufrir la enfermedad. El riesgo más alto lo presentan los individuos con historia familiar de cáncer de mama, especialmente cuando se ha dado en jóvenes, en distintos miembros de la familia, o los antecedentes son maternos y paternos. Sin embargo, cabe decir que más de dos tercios de los pacientes con cáncer de mama no presenta ninguno de estos factores.

Rasgos anatómicos de la mama

Las mamas son órganos glandulares pares especializados en la secreción de la leche. Están constituidas por la piel y tejido adiposo y conectivo subcutáneo, que envuelve a las glándulas mamarias propiamente dichas. Como las sudoríparas, las mamarias son glándulas de tipo holocrino (es decir, que sus células secretoras se desintegran y forman

parte de la secreción); se suelen considerar embriológicamente como glándulas sudoríparas modificadas en su estructura y función hasta formar un conjunto glandular tubuloalveolar.

Cada glándula está formada por entre quince y veinte lóbulos, que se dividen en lobulillos formados por pequeños racimos redondeados de alveolos cuya cara interior

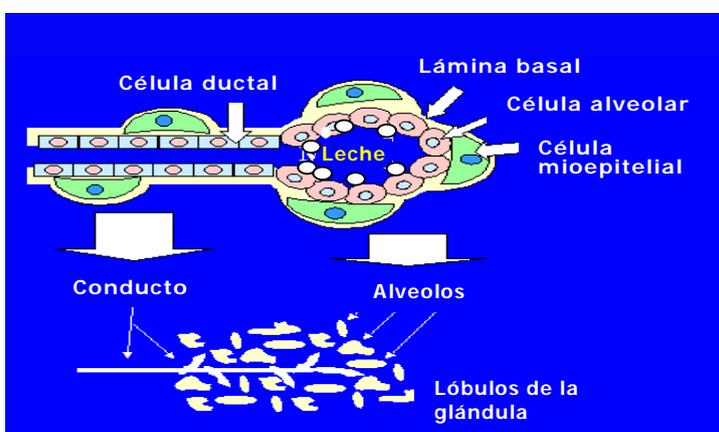


Figura 1.1.- Estructura de una glándula y de un alveolo mamario

está tapizada de células secretoras. Los alveolos desembocan en un conducto galactóforo menor, y los conductos galactóforos menores se unen para formar conductos mayores, que desembocan en conductos terminales. El número de conductos galactóforos terminales es también de quince a veinte, que convergen en la areola y forman debajo de ella unas dilataciones llamadas senos galactóforos, que sirven como pequeños depósitos de leche.

Todos estos elementos glandulares están embebidos en una trama de tejido conectivo firme y tejido adiposo, que se conoce como estroma mamario.

La mama está irrigada por las arterias mamarias interna y externa, y recibe además vasos de algunas anastomosis de la arteria intercostal de la rama pectoral de la arteria acromiotorácica. El plexo linfático es abundante y desemboca en los conjuntos ganglionares de la axila y el cuello.

Tipos de lesiones de la mama

Las lesiones mamarias suelen clasificarse según sus características morfológicas, desde el punto de vista anatomopatológico. Es de esperar que en un futuro próximo estas clasificaciones puedan incorporar características moleculares y perfiles de expresión génica específicos, que permitan una descripción más exacta del tipo de lesión, para así poder establecer un mejor pronóstico.

Las **lesiones precursoras** de un cáncer de mama son de dos tipos:

No proliferativas, como las metaplasias apocrinas, los quistes y las ectasias de los conductos galactóforos.

Proliferativas. Las que no presentan atipias son aquellas en que aparecen ya más de cuatro capas epiteliales, pero no muestran alteraciones citológicas, y se consideran benignas (en este grupo se incluyen, por ejemplo, los papilomas intraductales). En cambio, las que contienen células atípicas, además de presentar varias capas epiteliales, son lesiones muy similares a los carcinomas *in situ* y, en cierto modo son como su estadio previo. Según el origen celular, pueden ser ductales o lobulillares.

Los **carcinomas *in situ*** son lesiones proliferativas del epitelio glandular, con alteraciones citológicas característicamente malignas. A pesar de ello, no son infiltrantes (ni los ductales ni los lobulillares). Existen diversos tipos de lesiones ductales: cribiformes, papilares, comedones... Para valorar el riesgo de transformarse en carcinomas infiltrantes, se han ido contemplando diversas características morfológicas, que hasta cierto punto se correlacionan con el pronóstico: el grado de diferenciación de las células, el grado nuclear, la necrosis, etcétera.

Los **carcinomas infiltrantes** también pueden ser ductales o lobulillares. Los ductales son los más frecuentes: son casi el 90% de los tumores, según las clasificaciones de los anatomopatólogos, que además añaden en los informes otras características citológicas, fundamentalmente el "grado" (refiriéndose a la desdiferenciación y a la arquitectura

celulares, y a la compactación de la cromatina nuclear), la presencia de necrosis, etcétera, para facilitar una información a menudo correlacionada con el pronóstico clínico de los enfermos.

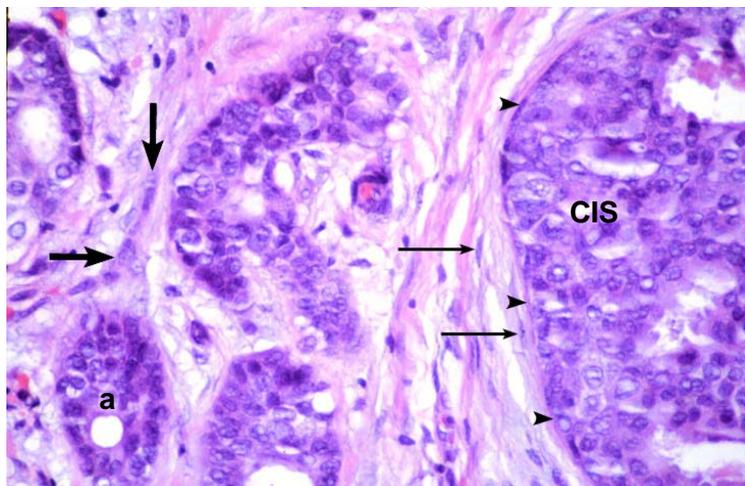


Figura 1.2.- Corte microscópico de un carcinoma de mama en que se observa una masa de células tumorales (carcinoma *in situ*, CIS) todavía confinadas dentro de la lámina basal (cabezas de flecha), coexistiendo con las células tumorales de un alveolo (a) infiltrándose en el tejido conectivo circundante (flechas gruesas). Las flechas finas señalan fibroblastos.

Progresión de las lesiones mamarias

Hasta hace pocos años, la proposición de que los carcinomas *in situ* puedan ser precursores de los carcinomas infiltrantes, y que, a su vez, puedan provenir de lesiones benignas, se fundamentaba solamente en las observaciones morfológicas de las lesiones (2,3). Sin embargo, nunca ha habido un consenso general entre los anatomopatólogos. La dificultad principal para establecer que existe una progresión de las lesiones benignas a las malignas ha sido, y es, la propia heterogeneidad de la enfermedad, ya que se comparan tumores de diferentes pacientes. La recurrencia, la ploidía, la proliferación celular, las alteraciones genéticas en oncogenes y genes supresores de tumores, o la expresión de receptores hormonales o de factores de crecimiento, eran características variables en los distintos tumores, y esto dificultaba la comprobación de la hipótesis de la progresión (4) (por otra parte, tan clara en otros tipos de tumores epiteliales, como los de colon) (5).

La utilización de las técnicas de biología molecular ha permitido comprobar que las pérdidas de heterocigosidad (LOH) detectadas en las lesiones benignas y en los carcinomas *in situ* se corresponden con las detectadas en los carcinomas infiltrantes, cuando los dos tipos se encuentran en el mismo paciente. En un análisis de loci específicos de las regiones cromosómicas 6q, 9p, 11q, 13q, 16q, 17q y 17p en 23 casos de carcinoma infiltrante, frente a otros 20 casos en que había carcinomas *in situ* y carcinomas infiltrantes del mismo paciente, se demostró el origen clonal de las lesiones, al tiempo que se sugería una divergencia, fruto probablemente de la inestabilidad genómica de estos tumores (6). Estos

estudios permitieron corroborar los datos previos, obtenidos al analizar pérdidas de regiones cromosómicas mediante técnicas de citogenética convencionales (7) o de FISH en cromosomas interfásicos, o por hibridación genómica comparada (8). Asimismo, se propuso un modelo según el cual los clones de células que compartían determinadas alteraciones cromosómicas con las células de las metástasis analizadas, tenían un origen común, y esto sugería que la diversificación, por lo que respecta a los cambios genéticos adicionales de las metástasis, bien podría ser consecuencia de la inestabilidad genética de las células tumorales y la selección de determinadas poblaciones.

Es evidente que el desarrollo de una lesión maligna de mama es el resultado de la acumulación de varias alteraciones genéticas. Estas podrían ser ganancias de función (como en la activación de los protooncogenes por mutaciones puntuales, translocaciones o amplificaciones) o pérdidas de función que, en general, afectan a los genes supresores de tumores por mutación o delección (hipótesis de Knudson (9)). En el caso de los oncogenes implicados en el cáncer de mama, las alteraciones se deben mayoritariamente a amplificaciones, que suelen afectar a regiones cromosómicas amplias, e incluso a brazos enteros de los cromosomas en que se encuentran estos oncogenes. Las principales localizaciones cromosómicas son 8q24 (c-myc), 11q13 (int-2, Bcl-2, EMS1, FGF3/4, CCND1), y 17q12 (c-erbB2/neu). Ninguna de estas regiones está amplificada en los casos de lesión benigna, y en cambio pueden estarlo en el carcinoma ductal in situ. El c-erbB2/neu es el caso más evidente, si bien el porcentaje de tumores que presentan la amplificación varía según el tipo histológico.

Por otro lado, las pérdidas de las proteínas codificadas en los genes supresores de tumores, como p53, son muy frecuentes en los carcinomas de mama avanzados. La ausencia de la proteína normal, o la expresión en su lugar de la proteína mutada, tiene graves consecuencias para la célula, puesto que la principal función de p53 es responder a las lesiones del DNA (poniendo en marcha un mecanismo de reparación) y evitar así el acúmulo de mutaciones potencialmente oncogénicas y el aumento de la inestabilidad genómica. Cuando se producen lesiones en el DNA, y mediante mecanismos bastante complejos, aumenta la concentración de p53 gracias a que se estabiliza y, a la vez, se activa por fosforilación. Estos cambios inducen la expresión de otras proteínas, que provocan una detención en la división celular y permiten la reparación del DNA. Si el DNA no puede ser reparado, p53 inicia una respuesta apoptótica, lo que elimina a la célula dañada y evita que las mutaciones pasen a las células hijas. Por este tipo de actuación, se la considera una especie de guardiana del genoma. Aproximadamente, en un 50% de los cánceres esporádicos de mama avanzados (concretamente, carcinomas ductales infiltrantes) las funciones normales de p53 están inactivadas (10,11); y, en consecuencia, presentan gran cantidad de alteraciones genéticas. Esto se debe a las pérdidas alélicas en 17p, a menudo acompañadas de mutaciones en el otro alelo (hipótesis de Knudson, 1971). Estas

mutaciones suelen afectar a la zona de unión de la proteína p53 al DNA (aminoácidos 90 a 295). Además, en esta región hay 5 codones "hotspot" (de gran frecuencia de mutación): 175, 245, 248, 249 y 273, donde se localizan el 20% de todas las mutaciones detectadas en el gen (revisado en (12)) Se han descrito también mutaciones de p53 en la línea germinal de individuos con el síndrome de cáncer hereditario de Li-Fraumeni, que se asocia con carcinomas epiteliales como el de mama (13).

Menos referencias se tienen en el caso de las mutaciones en el gen AT (de la ataxia telangiectasia) y del cáncer de mama hereditario. Sin embargo, este último no tiene una frecuencia superior al 10-12%, y lo más habitual es que estos tumores presenten mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 (esto ocurre en el 40-70% de los cánceres hereditarios de mama y de ovario). Probablemente, BRCA1 también está involucrado en el cáncer de mama esporádico, ya que su ausencia se relaciona con la pérdida de diferenciación del epitelio mamario, y además su correspondiente proteína (una fosfoproteína nuclear) se encuentra deslocalizada o ausente en la mayoría de los tumores y de las líneas celulares establecidas a partir de tumores humanos de mama (en su mayor parte, ductales infiltrantes).

Las pérdidas de heterocigosidad (LOH) son frecuentes en el cáncer de mama, y en concreto en las regiones 1q, 1p, 3p, 6q, 11p, 11q, 13q, 16q, 17p, 17q y 22q, lo que podría afectar a la expresión de genes clave en la regulación de la proliferación y diferenciación del epitelio mamario. Algunas de estas pérdidas se detectan en carcinomas ductales *in situ* y en carcinomas infiltrantes del mismo paciente (por ejemplo, las de 11q, 16q, 17p y 17q), y se cree que podrían favorecer la progresión hacia tumores más malignos.

Adquisición de la capacidad autocrina

El desarrollo y la proliferación celular están regulados en la mama normal por hormonas esteroideas (como los estrógenos y la progesterona) mediante receptores específicos en los epitelios ductales y lobulillares; por tanto, no sorprende que muchos tumores de mama mantengan características de dependencia hormonal. Sin embargo, a medida que los tumores progresan, adquieren una independencia del aporte de estas hormonas, de modo que se alteran los mecanismos de control del crecimiento. Muchos tumores avanzados pierden la expresión de los receptores de estrógenos (ER) por LOH (de la región 6q25), o expresan un receptor alterado por mutaciones puntuales, inserciones, etcétera, que afectan a la región de unión con el ligando. En otras ocasiones, las alteraciones en los tumores afectan a adaptadores y coactivadores (cromatina, componentes de la matriz nuclear, la metilación de la región promotora, etcétera), que podrían alterar la regulación transcripcional de estos genes, o afectar directamente a genes diana relacionados con la transmisión de las señales intracelulares mediada por estas

hormonas y sus receptores. La pérdida de la expresión de receptores hormonales, o su alteración, se considera de mal pronóstico en los tumores de mama.

El que haya células que escapen del control del crecimiento ejercido por las hormonas esteroideas y sus ligandos, se debe, sobre todo, a que han desarrollado estrategias alternativas para alcanzar un crecimiento descontrolado. Algunas de estas estrategias son, por ejemplo, la activación de determinados oncogenes como myc, int-2 , erbB2 o EGFR, o bien la alteración genética en genes supresores de tumores como BRCA1 y p53 entre otros.

Modelo simplificado de la progresión tumoral

Este conjunto de datos ha permitido proponer la hipótesis de un modelo simplificado de progresión tumoral, desde el epitelio normal de mama hasta tumores muy malignos, capaces de metastatizar por todo el organismo (**figura 1.3**). En este modelo, se suceden diferentes etapas escalonadas, en las que se han ido encontrando diferentes alteraciones genéticas que podrían explicar cómo la célula va adquiriendo una mayor independencia de los controles de proliferación y perdiendo diferenciación, características ambas de los tumores malignos.

En resumen, como pasa también en otros tumores epiteliales, el cáncer de mama es, en la mayoría de los casos, el resultado del acúmulo de diversas alteraciones genéticas que confieren a la célula una autonomía de proliferación y una pérdida de diferenciación. Ambas

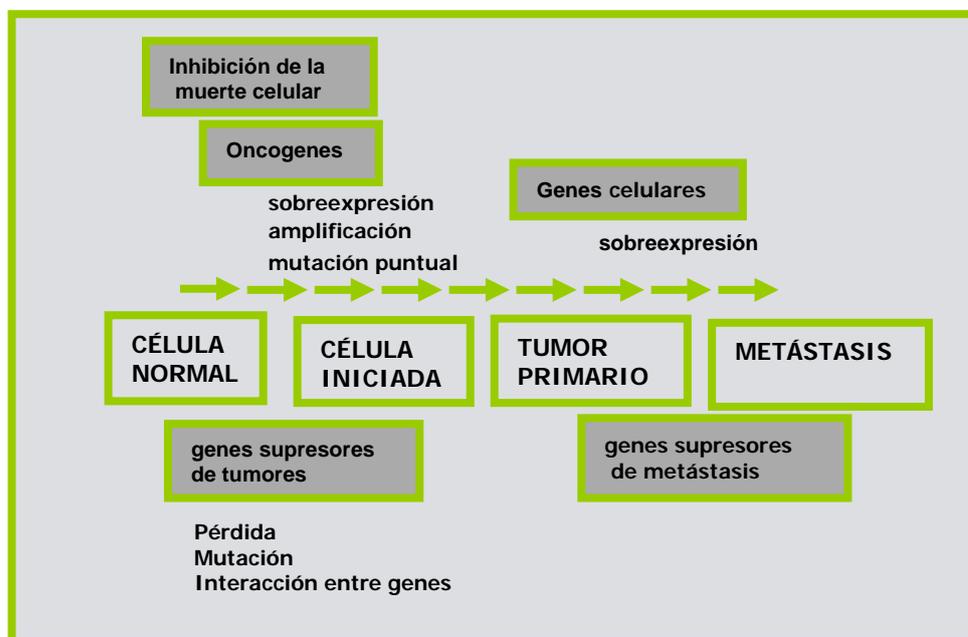


Figura 1.3.- Modelo simplificado de progresión tumoral. Mediante procesos como la inhibición de la apoptosis, la intervención de oncogenes por distintos medios o la inactivación de genes supresores de tumores, las células normales pueden transformarse en tumorales. La sobreexpresión de diferentes genes celulares o la ausencia de expresión de genes supresores de metástasis pueden permitir que una célula tumoral adquiera capacidad metastásica.

características comportan la pérdida del control homeostático y de las funciones celulares y fisiológicas que le corresponderían.

Sin embargo, la pérdida de la organización epitelial no tiene efectos únicamente sobre las células del carcinoma, sino también sobre las del estroma que lo rodea y sostiene. De esta manera, las células del carcinoma alteran la expresión (la síntesis y la activación) de moléculas como el TGF- β (*tumor growth factor* β) y otras citoquinas que tienen como diana el estroma. Estas influencias de un compartimiento (carcinoma) sobre el otro (estroma), y viceversa, son paracrinas y yuxtacrinas (14). Algunas moléculas como el HGF (*hepatocyte growth factor*), la tenascina y la estromelina-3 son reguladas normalmente por las interacciones entre el epitelio y el estroma; y en el caso de los carcinomas, y como resultado del desequilibrio, pueden influir sobre las características invasivas de las células.

1.2.- EL PROCESO METASTÁSICO

En Europa, fallecen anualmente 1,6 millones de pacientes oncológicos, lo que representa aproximadamente la cuarta parte de todas las muertes (15). Las metástasis son la causa principal de estas muertes, pues si bien el tumor primario puede ser erradicado por cirugía, quimioterapia o radioterapia, las células metastásicas con frecuencia resisten los tratamientos quimioterápicos o radioterápicos, y además pueden originar nuevos focos tumorales incluso años después de la exéresis quirúrgica. Las observaciones clínicas y los estudios experimentales demuestran que ciertos tumores malignos producen metástasis preferentemente en determinados órganos, con independencia de la anatomía vascular, el flujo sanguíneo y el número de células tumorales que llegan a dicho órgano en particular. Por el contrario, en las últimas fases de la enfermedad las metástasis pueden darse en muchos órganos, se vuelven más agresivas y provocan el fallecimiento del paciente. Por lo tanto, tras el diagnóstico de tumor primario, el objetivo primordial de los especialistas en oncología es el pronóstico y la prevención, y en su caso la erradicación, de las metástasis establecidas.

La mayoría de los tumores progresan hacia un fenotipo maligno, es decir metastásico. A lo largo de esta progresión, se genera en el tumor primario un conjunto heterogéneo de poblaciones celulares como consecuencia -al menos en parte- de la inestabilidad genómica. Algunas células (una de cada 10^9 células del tumor primario) serán capaces de metastatizar en un órgano o tejido secundario. Se denomina proceso metastásico al conjunto de etapas que tienen lugar desde que las células se liberan del tumor primario hasta que forman una lesión metastásica en tejidos u órganos distintos. Resumidamente, estas etapas son:

- Liberación de las células desde el tumor primario.
- Invasión del estroma celular que circunda el tumor primario y migración a su través.

- Neoangiogénesis: generación de nuevos vasos sanguíneos que asegura el aporte de nutrientes a las células tumorales.
- Intravasación: penetración en los vasos sanguíneos o en los canales linfáticos.
- Transporte por el sistema circulatorio. Las células tumorales deben sobrevivir a las defensas inmunes del organismo y a las turbulencias de la circulación.
- Detención en algún punto concreto de la red vascular.
- Extravasación: salida desde el vaso hacia el parénquima celular.
- Nuevo período de angiogénesis.
- Proliferación y crecimiento del nuevo tumor en otros órganos.

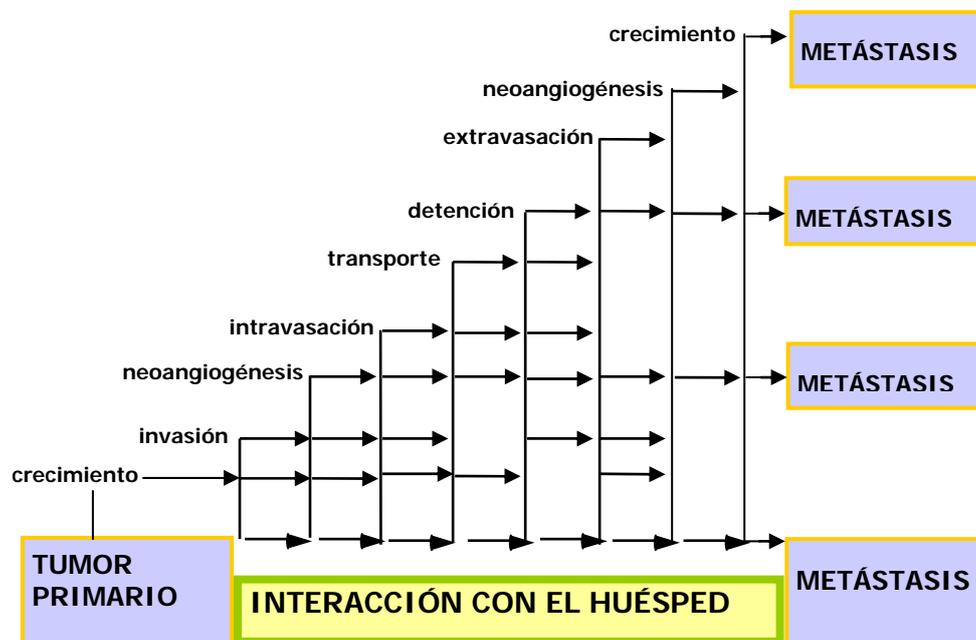


Figura 1.4.- Etapas del proceso metastásico. En el esquema se muestran las principales etapas del proceso, y se representa gráficamente el hecho de que el proceso se interrumpe si cualquiera de las etapas no se produce. El estudio de cada una de estas fases resulta interesante, puesto que a cada uno de ellas se pueden dirigir posibles acciones para evitar la diseminación metastásica.

Todas estas etapas son imprescindibles para completar el proceso: si una célula no puede superar alguna de ellas, no originará metástasis. Esto supone que las células habrán de ser capaces de producir en cada momento las proteínas necesarias para pasar de una etapa a la siguiente (proteasas, factores de crecimiento, etcétera). Por tanto, sólo las células que hayan sufrido los cambios genotípicos que les permitan adecuarse a cada nueva exigencia podrán terminar colonizando órganos distantes de aquel en que estaba el tumor primario.

1.3.- MODELOS EXPERIMENTALES DE CÁNCER DE MAMA METASTASICO

Los modelos experimentales de tumores de estirpe epitelial son una herramienta imprescindible para el estudio del cáncer, y en concreto de la progresión tumoral, puesto que permiten estudiar las capacidades tumorogénicas y metastásicas de las células tumorales *in vivo*. La mayoría de los modelos han sido obtenidos tras el establecimiento *in vitro* de líneas celulares derivadas del tumor primario, bien sea éste de procedencia murina o humana. Las líneas celulares establecidas pueden implantarse sucesivamente en animales de experimentación sanos e inmunocompetentes, en los que se desarrolla un tumor primario cuyas características –tales como el periodo de latencia, el ritmo con que el tumor dobla su volumen, y sus rasgos histológicos- son reproducibles en animales sanos de la misma especie, sexo y edad, siempre y cuando se mantengan en unas condiciones estandarizadas de estabulación. Se denominan líneas o tumores trasplantables según se implanten, respectivamente, células procedentes de cultivo *in vitro* o fragmentos de tumor obtenidos de otro animal.

Por otra parte, si bien el origen de los tumores es clonal (16), en el momento en que se detecta la presencia de un tumor primario son ya varias las poblaciones celulares que forman parte de él. Aunque mantienen un origen genómico común, estas poblaciones difieren en muchos aspectos fenotípicos e incluso genotípicos como consecuencia de la inestabilidad genética intrínseca de las células tumorales y la presión selectiva del ambiente en el que se encuentran en el seno del propio tumor (17), además de la ejercida por el huésped (18) o por los tratamientos a los que éste se somete. Las líneas celulares procedentes del tumor primario original se denominan parentales y mantienen la heterogeneidad de poblaciones, siempre y cuando las condiciones de propagación y mantenimiento *in vitro* sean estandarizadas.

Así pues, a partir de las líneas parentales pueden seleccionarse poblaciones distintas que difieren fenotípicamente entre sí (19). Los modelos experimentales de metástasis consisten en un conjunto de líneas celulares que, aunque derivadas de un mismo tumor primario, cuando son implantadas en animales inmunocompetentes (con respecto al tumor de origen) presentan un fenotipo distinto en cuanto a la capacidad de desarrollar o no metástasis espontáneas en órganos distintos al del lugar donde se ha implantado el tumor. Las metástasis espontáneas aparecen única y exclusivamente tras la implantación ortotópica (es decir, en el órgano donde inicialmente se desarrolló el tumor primario; por ejemplo, si se trata de carcinomas de mama, las células se implantan en la grasa de una de las mamas de un animal sano), y pueden detectarse en los animales de experimentación incluso tiempo después de la erradicación del tumor primario. Además, las metástasis se desarrollan en órganos concretos y preferenciales según el tipo de tumor primario (20). Así, los modelos experimentales de carcinomas de mama lo hacen en los ganglios linfáticos, en pulmones, en hueso, en hígado o en el cerebro, mientras que otros tipos de tumores, como

los de colon, desarrollan metástasis espontáneas preferentemente en el hígado, además de colonizar los ganglios locoregionales (18).

El aislamiento de poblaciones metastásicas espontáneas a partir del tumor primario, se consigue tras la extracción quirúrgica de los escasos nódulos metastásicos que aparecen espontáneamente (en el pulmón u otro de los órganos diana); se establecen en cultivo *in vitro* y vuelven a inocularse ortotópicamente en animales sanos e inmunocompetentes. Tras un número variable de ciclos repitiendo este procedimiento, las poblaciones aisladas mantienen un fenotipo estable y mucho más agresivo desde el punto de vista tumorogénico y metastásico en comparación con el de la línea parental. El aislamiento de poblaciones a partir de la línea parental también puede realizarse por dilución límite y expansión clonal *in vitro*, tras lo cual se estudia la capacidad tumorogénica y metastásica espontánea en animales inmunocompetentes.

En el presente trabajo se han utilizado dos modelos experimentales de metástasis de cáncer de mama: uno de procedencia murina y otro humano (los modelos MXT y MDA MB-435, respectivamente).

Modelo experimental MXT

MXT es un carcinoma de mama trasplantable, desarrollado inicialmente por Watson y colaboradores mediante carcinogénesis química. El tumor original fue obtenido de una hembra B6D2F1 (C57BL x DBA2F1) tratada con uretano, que era portadora de una isografía pituitaria implantada quirúrgicamente en la cápsula renal. El tumor original tenía morfología de carcinoma ductal papilar y presentaba características morfológicas similares a las de un carcinoma ductal humano (21). A partir del tumor original, se estableció una línea en cultivo *in vitro* (denominada MXT-S o línea parental en el presente trabajo). La inoculación intramamaria de células procedentes de cultivos exponenciales de MXT-S produce tumores en animales singénicos C57Bl6, o en los híbridos B6D2F1, que conservan las características del tumor original: concretamente son tumores poco diferenciados, pero que mantienen la expresión de receptores de estrógenos y progesterona y no presentan diferencias con los tumores desarrollados tras la implantación de fragmentos de tumor procedente de otros animales (22). En nuestro laboratorio pudimos comprobar la dependencia hormonal de este tumor experimental al implantar las células en hembras ovariectomizadas, observando un aumento de dos veces en el tiempo de latencia (tiempo transcurrido desde la implantación de las células tumorales hasta la aparición del tumor).

El conjunto de variantes MXT con distinto potencial metastásico utilizadas en el presente trabajo incluye (ver **figura 1.5**):

- **MXT salvaje(S)**: línea parental procedente de un tumor inducido químicamente (con uretano) en ratones BDF-1. Se trata de células sensibles a estrógenos y progesterona, tumorógenas en hembras adultas BDF-1 y en ratones desnudos; tienen capacidad invasiva, pero raras veces originan metástasis de manera espontánea (es decir, cuando se inyectan en

la mama), y solo ocasionalmente de manera experimental (es decir, cuando se inyectan intravenosamente). Estas células constituyen una población genéticamente heterogénea.

- **MXT-E2**: clon seleccionado a partir de la línea parental. Está constituido por células dependientes del aporte de estrógenos para su crecimiento. Es un clon tumorígeno en hembras adultas BDF-1 y en ratones desnudos, pero no metastásico.

- **MXT-C1**: clon aislado por dilución límite *in vitro* de las células MXT-S. Constituido por células cuyo crecimiento es independiente del aporte hormonal, es tumorígeno en hembras adultas BDF-1 y en ratones desnudos, invasivo y moderadamente metastásico en pulmón cuando se implanta ortotópicamente en mama. Produce esporádicamente metástasis ganglionares y óseas.

- **MXT-B2**: clon seleccionado a partir de un nódulo metastásico en el pulmón de ratones a los que se habían inyectado células de la línea parental, y enriquecido de *in vitro* a *in vivo* en sucesivos pasos. Sus células son hormonoindependientes, y originan tumores en hembras adultas BDF-1 y en ratones desnudos. Es un clon invasivo y muy metastásico en pulmón, especialmente cuando las células son inoculadas por vía endovenosa.

- **MXT-C1.1**: clon seleccionado a partir de un nódulo metastásico en el pulmón de ratones a los que se habían inyectado células del clon c1, y enriquecido de *in vitro* a *in vivo* en sucesivos pasos. Sus células son hormonoindependientes y originan tumores en hembras adultas BDF-1 y en ratones desnudos. Es extraordinariamente invasivo y muy metastásico en pulmón; produce un gran número de metástasis espontáneas o experimentales.

- **MXT-clones 1-15**: clones seleccionados por dilución límite *in vitro* a partir de la línea parental.

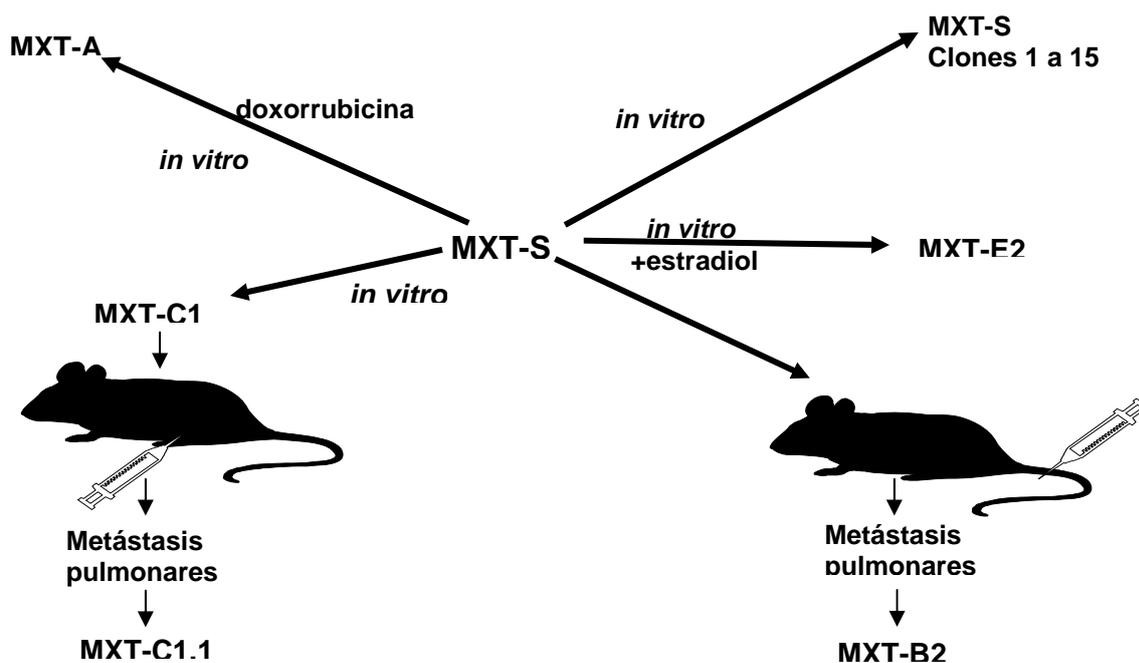


Figura 1.5.- Esquema de obtención de las variantes analizadas en el modelo

Modelo de carcinoma de mama humano MDA-MB-435

- **MDA-MB-435 P:** línea parental aislada de un exudado pleural de una paciente con cáncer de mama (23). Es hormonoindpendiente, tumorigénica en ratones desnudos y "scid". Produce metástasis pulmonares y linfáticas cuando es implantada ortotópicamente en la mama. Consiste en una población genéticamente heterogénea.

- **MDA-MB-435 Br-1:** línea celular establecida a partir de una metástasis cerebral espontánea de un ratón inoculado ortotópicamente con la línea parental (24). Poco metastásica y poco invasiva.

- **MDA-MB-435 Lung-2:** línea celular establecida a partir de una metástasis pulmonar espontánea de un ratón inoculado ortotópicamente con la línea parental, y enriquecida de *in vitro* a *in vivo* en sucesivos pases (24). Muy metastásica y muy invasiva.

- **MDA -MB-435 -Liver, LN :** variantes IRO en actual caracterización.

- **MDA -MB-435 -L- clones 1-18 :** clones seleccionados por dilución límite *in vitro* a partir de la línea parental.

La utilización de variantes celulares procedentes de un mismo tumor, que por tanto comparten los mismos antecedentes genéticos, puede simplificar los análisis y aportar una información de relevancia biológica a nivel molecular y celular.

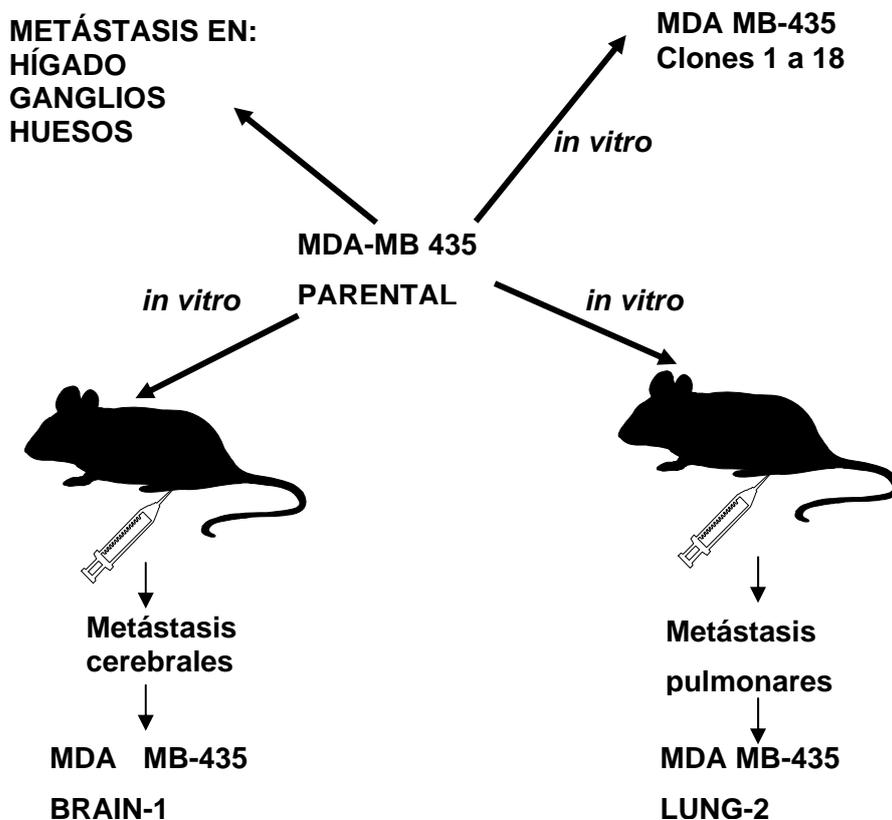


Figura1.6.- Esquema de la obtención de las diferentes variantes metastásicas de MDA MB-435

1.4 .- DETECCION DE GENES ASOCIADOS AL FENOTIPO METASTASICO

La búsqueda de genes relacionados con el proceso metastásico ha sido un objetivo muy perseguido en los últimos años en la investigación sobre el cáncer. El hecho de que muchos laboratorios hayan conseguido obtener distintos tipos celulares (tanto de roedores como de humanos) con diferentes capacidades metastásicas, ha permitido ir definiendo celular y molecularmente el denominado fenotipo metastásico: cada vez se conoce mejor qué tipos de moléculas intervienen en cada una de las etapas del proceso, aunque todavía se está lejos de conocer con exactitud de qué manera su actuación normal o su alteración influyen en la progresión metastásica.

Se han utilizado diferentes estrategias para tratar de identificar genes implicados en el proceso metastásico. Las principales han sido: la transfección de genes concretos o la transferencia de cromosomas a células receptoras, la fusión celular (u obtención de híbridos somáticos) y la hibridación diferencial entre tipos celulares de diferente capacidad metastásica.

Los **experimentos de transfección** consisten en transferir DNA de un gen concreto (como *ras*, *myc*, etcétera.) de las células metastásicas a las tumorógenas, pero no metastásicas, para comprobar si estas últimas adquieren el fenotipo metastásico y, por tanto, asumir que el DNA transferido contiene información necesaria para desencadenar dicho fenotipo. Sin embargo, esto supone aceptar que las células receptoras expresan el resto de productos génicos necesarios para la metástasis, lo cual, vista la complejidad del proceso metastásico, es cuando menos sorprendente. Además, este método no permite identificar genes que intervengan mediante su desactivación (es decir, genes supresores de la metástasis). De momento, no se han identificado genes candidatos por esta vía.

Inicialmente, la existencia de *genes supresores de metástasis* fue una suposición basada en los resultados de la **fusión celular** entre células tumorales metastásicas y no metastásicas, ya que los híbridos somáticos que mantenían la dotación cromosómica completa no producían metástasis espontáneas al ser implantados en los animales (25), aunque no se alteraba su tumorigenicidad (formación del tumor y periodo de latencia). Ichikawa y colaboradores fueron los primeros que asociaron determinadas pérdidas cromosómicas (como la del cromosoma 2 de rata) con la readquisición del fenotipo metastásico en el carcinoma Dunning de próstata de rata (26).

Estas observaciones coincidieron con el desarrollo de la técnica de **transferencia cromosómica** o MMCT (*microcell-mediated chromosomal transfer*), que se aplicó entonces a este mismo modelo, lo cual permitió asociar a los cromosomas humanos 12 y 17 con la supresión de la capacidad metastásica (27,28). Por ello, diversos laboratorios han utilizado la técnica de MMCT para probar el efecto sobre el fenotipo metastásico de alteraciones cromosómicas -tales como determinadas LOH- frecuentemente detectadas en las muestras metastásicas de procedencia clínica. Se ha descrito que determinadas regiones de los

cromosomas 1, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 16 y 17 ejercen un efecto supresor de las metástasis espontáneas de melanoma (29,30), de carcinomas de próstata (31,32) y de mama (33). Estos estudios, combinados con técnicas de clonación posicional, han permitido la identificación de genes como KAI1 (34), KISS-1 (35), MKK4/SEK1 (36) y BRMS1 (37), considerados como verdaderos genes supresores de metástasis, es decir que suprimen la formación de metástasis espontáneas sin afectar al desarrollo y crecimiento del tumor primario.

Aunque es evidente que los genes supresores pueden determinar por sí mismos el fenotipo metastásico de diferentes células tumorales (38), sería erróneo establecer un perfil metastásico único en cuanto a expresión génica (universal para todos los tumores, con independencia del tipo histológico) que estuviera restringido a los genes supresores de metástasis (por ejemplo no todas las células metastásicas tienen la restricción de *KAI 1*, *KISS-1*...). Por otra parte, se sabe que el fenotipo metastásico implica un número determinado de cambios en la expresión génica, que pueden aportar una mayor información de las etapas clave del proceso metastásico y que son hoy en día analizados mediante las técnicas que se detallan a continuación.

El método de **hibridación diferencial** consiste en la hibridación entre una genoteca de cDNA y sondas procedentes de células metastásicas y de células no metastásicas, de manera que permite la detección de diferencias entre la expresión de determinados genes. Mediante este método sólo se pueden detectar transcritos de mRNA de abundancia superior al 0,01% del total de mRNAs. Pero si se realiza después de haber hecho una **hibridación sustractiva**, que consiste en eliminar secuencias comunes a las poblaciones metastásicas y no metastásicas en estudio, el método permite detectar mRNAs que constituyan solo un 0,001%. Gracias a este método, se han propuesto diversos genes supuestamente implicados en el proceso metastásico, entre ellos el *mta-1* (39), la fibronectina (40), el WDNM 1 y 2 (41,42), o el *nm23* (43). En el caso de este último, es su ausencia la que se ha demostrado relacionada con la aparición de metástasis.

A pesar de su utilidad, los métodos de hibridación tienen como inconvenientes su laboriosidad y el no permitir más que comparaciones dos a dos de las muestras de mRNA. Estos inconvenientes pueden evitarse utilizando métodos de **representación diferencial (*differential display*) del RNA**, que permiten, de manera relativamente sencilla y rápida, la comparación simultánea de patrones de expresión génica de diferentes poblaciones celulares que presenten las características distintivas que se pretende estudiar.

En el presente trabajo, se ha utilizado una estrategia de este tipo para comparar los patrones de expresión de poblaciones celulares de distinta capacidad metastásica. El método se basa en una reacción en cadena de la polimerasa con cebado arbitrario partiendo de RNA (abreviadamente, RAP-PCR, del inglés *RNA arbitrarily primed PCR*).

El método consiste, a grandes rasgos, en la extracción del mRNA celular, en su transcripción inversa para obtener cDNA, y en la posterior amplificación por PCR de

fragmentos del cDNA. Puesto que se utilizan cebadores arbitrarios (no específicos), lo que se analiza con este método son poblaciones anónimas de RNA; es decir, que se desconoce a qué mRNA corresponden los fragmentos de cDNA obtenidos. Los productos de la PCR (marcados radiactivamente) se separan mediante electroforesis y se observan las diferencias entre las bandas que aparecen en los carriles correspondientes a las células de distintas características. Posteriormente, se aísla el cDNA que presenta diferencias, se clona y se trata de identificar, puesto que representa un candidato a formar parte de un gen implicado en el proceso metastásico.

Existen diversos procedimientos en que se siguen estas líneas generales. Las diferencias principales entre ellos estriban en la utilización de un tipo u otro de cebadores en la

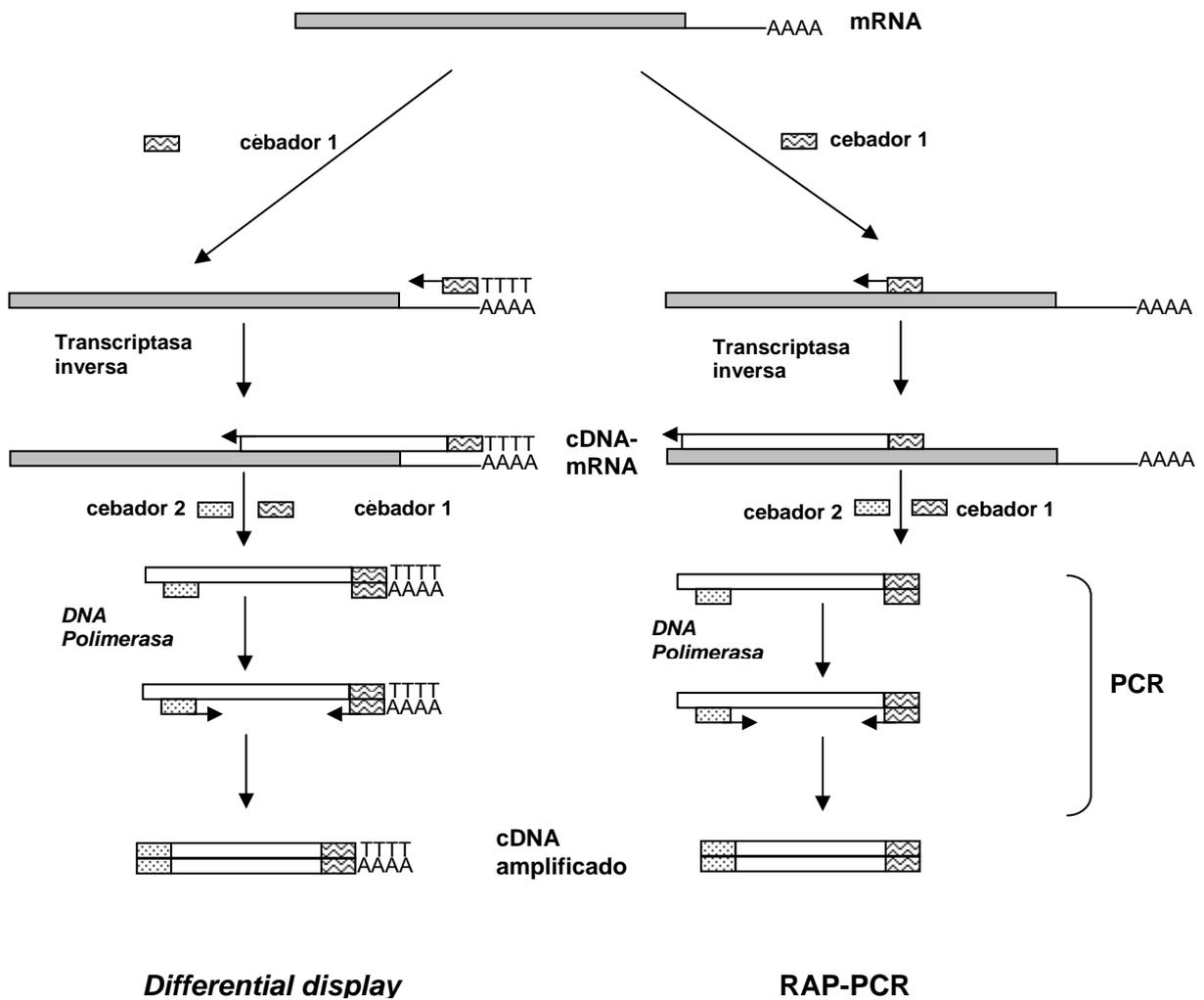


Figura 1.7.- Esquema de las diferencias entre “differential display”(DD) y RAP-PCR. En el DD se utiliza un primer cebador con una secuencia poliT que se complementa con la cola de poliA del mRNA, mientras que en RAP-PCR se emplea un cebador arbitrario. Después de obtener el cDNA por acción de la transcriptasa inversa, en ambos casos se hace una PCR con otro cebador cualquiera

transcripción inversa (ver **figura 1.7**). Así, una de las posibilidades (que suele denominarse *RNA differential display*) es emplear como cebadores secuencias de nucleótidos de politimina (oligo-dT-NN), de manera que se obtengan fragmentos de cDNAs desde el mismo extremo 3' del mRNA (44). Otra posibilidad es emplear un cebador arbitrario (de ahí que se denominara RAP), de forma que se obtengan fragmentos de cDNA que, a priori, pueden corresponderse con cualquier parte del mRNA (45). Los cebadores empleados en la posterior PCR son el mismo de la transcripción inversa más otro arbitrario (en el caso de que ya se hubiese usado uno arbitrario, puede ser el mismo o no). Por tanto, en realidad, ambos procedimientos utilizan al menos un cebador arbitrario.

Recientemente, la tecnología de **microarrays o biochips** se ha considerado como una alternativa revolucionaria para la identificación de genes cuyos niveles de expresión son distintos dependiendo de cambios celulares o simplemente por la influencia del ambiente (46-48). Los arrays o matrices consisten en una disposición ordenada de muestras sobre un soporte (de nylon o de vidrio) para su posterior emparejamiento (hibridación) con muestras de DNA /cDNA, bien sean conocidos o desconocidos. Las principales dificultades de la tecnología de los microarrays son su fabricación y la interpretación de los resultados. Por este motivo, es crucial el diseño experimental sobre el cual se aplican (49).

1.5.- MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS ASOCIADOS AL FENOTIPO METASTÁSICO

La adquisición del fenotipo metastásico se produce en la célula como consecuencia de los cambios en la expresión de determinados genes, bien sea de forma constitutiva o transitoria, pero que en definitiva le permiten pasar de una etapa a la siguiente. En resumen, los cambios en la expresión génica en una etapa concreta del proceso son cruciales para la adquisición del fenotipo metastásico y por ello dichos genes se consideran hoy en día como genes efectores del proceso metastásico. Sin embargo, no sólo son los genes *per se*, sino también su papel fisiológico y las posibles vías de regulación de su expresión o de su actividad las que nos permitirán conocer a fondo los mecanismos de la metástasis.

A continuación se comentan los cambios fenotípicos que deben tener lugar en las células para que éstas puedan llegar a producir metástasis, y se explica la actividad de algunos de los genes que intervienen.

TRANSICIÓN EPITELIO-MESÉNQUIMA

Una de las características de la progresión tumoral de los carcinomas es la pérdida de la diferenciación epitelial. Este mismo hecho ocurre durante el desarrollo embrionario. La pérdida de las características epiteliales y en consecuencia de las uniones célula-célula, va acompañada de la adquisición de la capacidad migratoria e invasiva de dichas células, las cuales adoptan un fenotipo "fibroblastoide".

A) Moléculas implicadas en la adhesión entre células.

Inmunoglobulinas independientes de Ca^{2+} . Sólo unos pocos miembros han sido asociados con la invasión: N-CAM (*neural cell adhesion molecule*)(50), CEA (antígeno carcinoembrionario), DCC (*deleted in colon cancer*) y MUC-18, estrechamente relacionada con N-CAM y CEA.

Moléculas de adhesión dependientes del Ca^{2+} . Denominadas cadherinas (51), forman una gran familia y son las que se consideran relevantes para el mantenimiento de las interacciones célula-célula y las características epiteliales. Todas ellas presentan una gran homología, no sólo en el dominio citoplasmático de la molécula, sino también en los dominios extracelulares. Las uniones célula-célula en que median las cadherinas se deben mayoritariamente a la interacción entre los dominios aminoterminales de moléculas idénticas en células vecinas (52), es decir que son de tipo homofílico. Sin embargo, la efectividad de las uniones depende además de la interacción del dominio citoplasmático de la cadherina con otros componentes – α , β y γ -cateninas- que actúan de puente en la asociación al citoesqueleto de actina (53), entre otras funciones específicas. El principal sistema de adhesión entre las células epiteliales es el complejo cadherina-E/cateninas, que resulta esencial para el mantenimiento de la homeostasia epitelial. La pérdida de las uniones intercelulares es un requisito previo para que las células puedan desarrollar un fenotipo invasivo. Una serie de pruebas acumuladas en la última década indican que la pérdida de expresión o función de cadherina-E (CD-E) es un paso determinante de las etapas iniciales de la invasión tumoral (54-56).

Estudios recientes en modelos experimentales animales y humanos han puesto de manifiesto el papel del factor de crecimiento TGF- β 1 como inductor de las transiciones epitelio-mesénquima en la progresión tumoral (57). TGF- β 1 tiene un doble papel en la carcinogénesis: actúa como un supresor en las fases tempranas del desarrollo tumoral (en virtud de su función como inhibidor de la proliferación de las células epiteliales) y como un estimulador de la progresión maligna en las últimas etapas de la carcinogénesis. La respuesta invasiva al factor está asociada con una remodelación de la matriz extracelular mediada, entre otros factores, por la inducción de proteasas que degradan de forma controlada la matriz y favorecen la migración celular (58-60).

B) Moléculas implicadas en la adhesión de las células a la matriz extracelular.

La pérdida de diferenciación epitelial va acompañada de cambios en la expresión de receptores específicos para cada uno de los componentes de las matrices extracelulares. En este ámbito, son las **integrinas** los receptores por excelencia. Esta es una gran familia, de más de 20 miembros compuestos de subunidades α y β . Cada combinación $\alpha\beta$ tiene su propia especificidad por uno o más sustratos o componentes de la matriz extracelular (como laminina, fibronectina, colágeno, vitronectina). Las integrinas no sólo permiten el anclaje al

sustrato, sino que por sus características transmembranarias median en la transducción de señales desde el medio extracelular hasta el interior de la célula mediante su región intracitoplasmática. En el citoplasma, distintas proteínas conectan y median las señales hacia el citoesqueleto, quinasas citoplasmáticas y receptores de factores de crecimiento. Las diversas integrinas influyen así sobre distintas funciones biológicas como la migración, la diferenciación, la proliferación y la apoptosis (61). Desde los años 90, distintos estudios inmunohistoquímicos han demostrado la existencia de cambios cuantitativos y cualitativos en el patrón de expresión de integrinas en diferentes tipos tumorales.

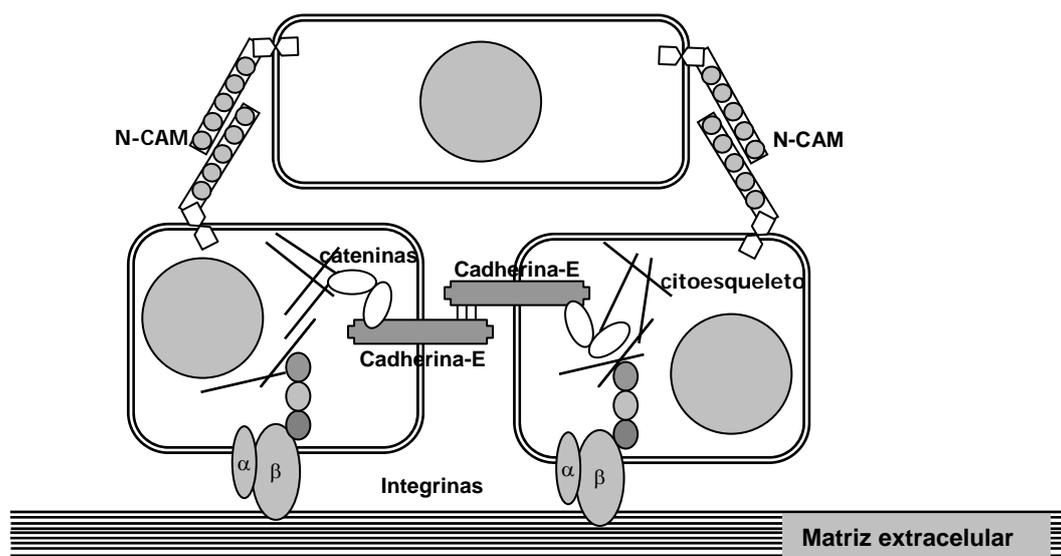


Figura 1.8.- Esquema de las funciones de unión de las moléculas de adhesión. Las proteínas de la familia de las inmunoglobulinas (como N-CAM), intervienen en las uniones intercelulares, al igual que las cadherinas, que se conectan con el citoesqueleto mediante las cateninas. Las integrinas sirven a las células para unirse a distintos componentes de la matriz extracelular

Algunas proteínas de la familia de las "*β-galactoside-binding lectin family*" (**β-Galectin**) presentan la capacidad de unirse específicamente a la laminina (62). De hecho, diversas células tumorales expresan un receptor específico para la laminina en sus membranas celulares, que no es una integrina, sino una glicoproteína de 67kDa (67 LR) (63-65). Es importante tener en cuenta que las células metastásicas expresan un número mayor de moléculas de este tipo de receptor que las no metastásicas (66-68). Este hecho es espectacular en el caso del cáncer de mama, donde el número de receptores de la laminina se correlaciona con el número de ganglios invadidos (69).

Por último, es de señalar el papel de los **proteoglicanos** de la matriz extracelular y de la membrana celular. Su importancia biológica se debe a su capacidad de secuestrar moléculas bioactivas (como factores de crecimiento, proteasas e inhibidores) y retenerlos en la matriz extracelular o asociarlas a la membrana celular. Los proteoglicanos son grandes glicoconjugados compuestos por una proteína núcleo con una o más cadenas de

glicosaminoglicanos (GAGs) unidos covalentemente. Los GAGs son cadenas no ramificadas de polisacáridos, constituidas por unidades repetidas de disacáridos. Hasta el momento se conocen cuatro tipos de GAGs : el ácido hialurónico, heparán sulfato/heparina, condroitín sulfato/dermatán sulfato y keratán sulfato, todos ellos sintetizados en el trans-Golgi.

Uno de los proteoglicanos de membrana es **CD44**, una molécula heterogénea en cuanto a su tamaño, y de múltiples funciones, entre las que destacan la de intervenir en la adhesión célula-matriz extracelular vía ácido hialurónico, fundamentalmente. Su versatilidad es consecuencia de la existencia de diferentes isoformas. Al igual que otros genes de familias funcionalmente diversas (enzimas, receptores hormonales, integrinas...), el **CD44**, utiliza el "procesamiento alternativo" de al menos 12 de sus 19 exones para generar una gran diversidad en sus productos peptídicos. Con un dominio aminoterminal común, la secuencias variables se localizan justo en la porción extracelular adyacente al dominio transmembranario.

Se ha demostrado recientemente que algunas **variantes específicas** de la molécula de **CD44**, podían conferir el fenotipo metastásico, no solo en modelos de rata (70) sino también en cánceres humanos, como el de mama (71) y el de colon (72).

Probablemente, las isoformas de CD44 expresadas en las células tumorales actúan como mediadoras de la diapédesis y/o adhesión al endotelio vascular de la célula neoplásica en las etapas iniciales del proceso de invasión o metástasis. Asimismo, se ha observado que en las células tumorales, la molécula de CD44 puede sufrir un corte proteolítico (por una metaloproteasa) en la región proximal de la región transmembranaria del ectodominio (73). Ello se traduce en una liberación celular del sustrato (ácido hialurónico) al cual estaba anclada, lo que favorece la migración celular.

DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR.

Durante el proceso de invasión, las células tumorales tienen que atravesar necesariamente la matriz intersticial, compuesta sobre todo por proteoglicanos, glicoproteínas y proteínas filamentosas. Las metaloproteasas de la matriz (*matrix metalloproteinases*, MMP) constituyen una familia de enzimas de estructura muy similar, evolutivamente muy relacionadas y con distintas especificidades de sustrato (74). Por ejemplo, la MMP-1 degrada a los colágenos intersticiales (tipos I, II, y III) mediante un corte que rompe su estructura helicoidal.

Las MT-MMP (*membrane type-MMP*, asociadas a la membrana celular) se consideran hoy los principales reguladores de la proteólisis en la superficie celular, puesto que interaccionan con proteínas citoplasmáticas y citoesqueléticas y con receptores de la unión célula-célula o célula-matriz. Gracias a estas propiedades, promueven la migración celular, la invasión, las metástasis experimentales y la angiogénesis.

La actividad de las MMP está, a su vez, regulada por inhibidores específicos de metaloproteasas (TIMP). Los desequilibrios entre las actividades de las MMP y las de los TIMP desencadenan la degradación de los sustratos específicos, por lo que tienen un papel anti-invasivo y anti-metastásico (75). Los TIMP, al igual que otras moléculas de la matriz, tienen otras funciones contrarias a las anti-invasivas: pueden estimular la proliferación celular y facilitar la supervivencia de las células, y además facilitan la angiogénesis y la intravasación de las células tumorales (76).

Otra familia que interviene en la degradación de la matriz extracelular es la denominada ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*), compuesta por al menos 30 genes, cuyas proteínas tienen cierta similitud con las metaloproteasas de los venenos de serpiente (77), y se encuentran ampliamente representadas en los metazoos (aunque no existen en plantas y en bacterias), lo que sugiere que poseen funciones biológicas relevantes y bien conservadas.

Su denominación se debe a las dos funciones que parecen desempeñar: por una parte, actúan como metaloproteasas, y por otra intervienen en la adhesión celular. Estructuralmente, las ADAMs contienen diversas partes: una inicial, otra metaloproteásica, otra similar a desintegrina, otra rica en cisteínas, otra similar a EGF y otra citoplasmática, además de una zona transmembranaria. Al principio, se las asoció únicamente con los procesos de reproducción, como la espermatogénesis y la fertilización de los oocitos (78), pero recientemente se ha comprobado que la especificidad de sus partes les confiere un papel relevante en diversas interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, que intervienen en la modulación de la migración celular (79), la diferenciación de los osteoblastos (80), la adhesión de las células tumorales (81), o la activación de determinadas vías de señalización por liberación de citocinas o factores de crecimiento unidos a la membrana celular (82,83).

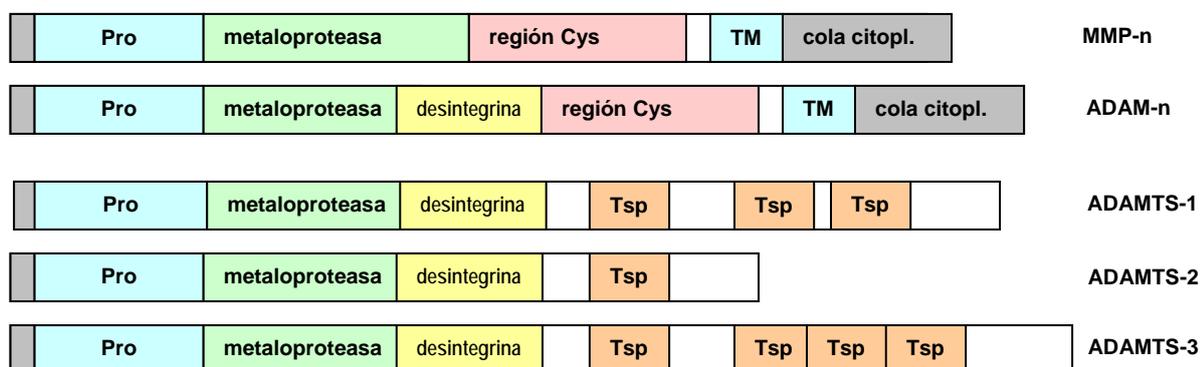


Figura 1.9.- Esquema comparativo de las estructuras moleculares de metaloproteasas de matriz (MMP), proteínas ADAM y ADAMTS. MMP y ADAM se muestran de manera genérica, ya que no todas son transmembranarias (la zona transmembranaria se designa aquí como TM). La diferencia principal de las ADAMTS es que, en vez de una región rica en cisteína, contienen al menos una zona similar a trombospondina 1 (Tsp), que les sirve para anclarse a la matriz extracelular, ya que no son proteínas transmembranarias.

En los últimos años, se han identificado y clonado nuevos miembros de la familia (19 hasta el momento (84)), conocidos como ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin domains*) (la información sobre el conjunto de todos ellos se encuentra en la siguiente dirección: <http://www.gene.ucl.ac.uk/cgi-bin/nomenclature/searchgenes.pl/adamts>). Como su nombre indica, contienen varias repeticiones de fragmentos de trombospondina 1 en su región carboxiterminal, pero han perdido los dominios transmembranarios característicos de los ADAM, tal como se puede ver en la **figura 1.9**.

Kuno y colaboradores identificaron en 1997, mediante *differential display*, al primer miembro de los ADAMTS -al que denominaron ADAMTS1-, y lo consideraron un “gen selectivo de tumores”, puesto que podía sobreexpresarse *in vitro* en células de la línea C26 de adenocarcinoma de colon murino, tras ser tratadas con interleuquina-1 α (85). Además, se observó la inducción de su expresión *in vivo* en corazón y riñón de ratones tratados con LPS, lo que sugería que ADAMTS1 podría estar asociada a los procesos inflamatorios.

ADAMTS1 es un gen único y distinto al de otros miembros de esta familia (a pesar de su parecido con ADAMTS-8), que se encuentra localizado en el cromosoma 16 de ratón y en la región q21.2 del cromosoma 21 humano.

El transcrito de ADAMTS1 tiene un tamaño de 4,6 kb, según se determina por análisis Northern. Se ha detectado en la mayoría de los tejidos sanos adultos, y su expresión más elevada se da en corazón, placenta y glándulas suprarrenales, seguida del músculo esquelético, tiroides, estómago e hígado. En cambio, en los tejidos fetales normales, la más elevada corresponde a los riñones. Recientemente, tras la obtención de ratones *knock-out* (ADAMTS1^{-/-}), se ha comprobado que la expresión de ADAMTS1 es imprescindible para el crecimiento normal y el desarrollo morfológico y funcional de los riñones y las glándulas suprarrenales, así como del útero y los ovarios, y en consecuencia afecta a la fertilidad (86).

ADAMTS1 es una proteína que se secreta al medio extracelular con un péptido señal en posición aminoterminal, una zona metaloproteásica con un sitio de unión a Zn²⁺ y una región rica en cisteínas que contiene dos posibles “bucles de desintegrina”. La región carboxiterminal de ADAMTS1 tiene tres zonas de fragmentos de trombospondina con capacidad de unión a la heparina, que contienen seis cisteínas y tres triptófanos. El tamaño de la proteína determinado por SDS-PAGE es de 110-kD, o bien de 85-kD tras la proteólisis en la zona de subtilisina, aunque cabe decir que la forma más abundante es de 67-kD, generada tras el procesamiento de la proteína.

Tras la secreción celular, ADAMTS1 se incorpora a la matriz extracelular mediante sus zonas de trombospondina-1, juntamente con la región carboxiterminal (87). Atendiendo a las propiedades antiangiogénicas de la trombospondina-1 (que bloquea la formación de estructuras en tubo semejantes a los capilares e inhibe la proliferación de las células endoteliales) asociadas a la región comprendida entre los aminoácidos 385-522, que

contiene tres repeticiones de tipo I (denominados properdina o TSP) (88), Vázquez y colaboradores plantearon en 1999 la hipótesis de que deberían existir moléculas desconocidas hasta entonces que tuvieran este tipo de motivos de repetición y ejercieran este papel antiangiogénico. Utilizando las regiones mencionadas como cebo frente a genotecas de cDNA de procedencia humana, consiguieron identificar a los genes METH-1 y METH-2, con homologías del 83% y 52% respectivamente con ADAMTS1 y ADAMTS-8 de ratón (89). Los productos de los genes METH-1 y METH-2 son potentes inhibidores de la angiogénesis en modelos experimentales *in vitro*, mucho más que otras moléculas como la angiostatina, la endostatina o la misma trombospondina, conocidas por este efecto.

Como consecuencia, Masui y colaboradores iniciaron un estudio para valorar la expresión de METH-1 y METH-2 en líneas celulares de carcinoma pancreático y un reducido número de muestras tumorales y tejidos normales de pacientes afectados. Aunque los resultados indicaban que la expresión de METH-1 no se relacionaba con la vascularidad de las muestras tumorales estudiadas, sí existía una correlación significativa en cuanto a la invasión local y la diseminación hacia los ganglios linfáticos, y en conclusión con el pronóstico de los pacientes (90).

Por otra parte, dada la doble funcionalidad de las moléculas de la familia ADAMTS (como antiangiogénicos y como proteasas específicas), deben considerarse en los procesos de remodelación de las matrices extracelulares y de invasión tumoral. Así, ADAMTS-2 y ADAMTS-3 son propeptidasas capaces de romper al procolágeno de tipo I y II (91), ADAMTS-4 y ADAMTS-5/11 son agrecanasas involucradas en la degradación del agrecano del cartílago, uno de los proteoglicanos más representado en estas matrices extracelulares (92), etc. Se ha descrito que también ADAMTS1 es una agrecanasa, además de ser capaz de romper al versicano (93). Para ejercer su acción proteolítica, ADAMTS1 precisa de la activación por furina, que corta por la secuencia de aminoácidos RKKR de la forma latente, estando el centro activo localizado en la zona de unión al zinc, tal como ocurre en las MMP y por ello es completamente inhibida por EDTA y 1,10-fenantrolina, y parcialmente por los inhibidores fisiológicos TIMP-2 y TIMP-3.

MIGRACIÓN CELULAR.

Otro de los requisitos para que una célula tumoral invada y sea metastásica es que adquiera la capacidad de locomoción, que incluye distintas etapas cíclicas: emisión–desplazamiento–contracción. En primer lugar, las células emiten pseudópodos o bien lamelipodios, que les permiten adherirse a sustratos específicos mediante sus correspondientes receptores. A continuación, se desplazan hacia el nuevo territorio, liberándose de los anclajes anteriores. Los receptores específicos, una vez liberados, son reciclados por endocitosis y transporte vesicular.

Como **quimioatrayentes** para las células tumorales están no sólo determinados factores de crecimiento como PDGF o IGF-1, sino también los componentes (o algunos de sus fragmentos) de las matrices extracelulares, como la laminina, la fibronectina, el colágeno y la elastina. Asimismo, se ha identificado un grupo de citoquinas -entre las que figura el "*scatter factor*"- producidas por los fibroblastos circundantes, que facilitan la migración de las células tumorales a través de la matriz de colágeno (94).

Entre las moléculas que facilitan la migración de las células metastásicas, cabe destacar una citoquina denominada *Autocrine Motility Factor* (AMF), producida por las propias células tumorales y localizada en las protrusiones pseudopodiales de las células invasivas (95).

Ahora bien, la locomoción activa implica también la **organización del citoesqueleto**. Este componente celular se consideró durante mucho tiempo un andamiaje pasivo dedicado sólo a mantener la forma celular, favorecer la adherencia de las células al sustrato y permitir su migración. Sin embargo, ciertos estudios recientes han demostrado el papel de algunos reguladores citoesqueléticos en procesos mitogénicos, tumorigénesis y enfermedades hereditarias. Por ejemplo, se ha visto que diversas proteínas citoesqueléticas actúan como oncoproteínas (β -catenina, proteínas Rho/Rac), como proteínas supresoras de tumores (cadherinas, merlina), o como coadyuvantes del ciclo infeccioso del virus del SIDA (proteínas Rho/Rac) ((96-99)).

Las **GTPasas Rho y Rac** participan en la generación de respuestas celulares a diversos estímulos extracelulares, y son importantes para promover la formación de estructuras citoesqueléticas que facilitan cambios en la forma y movilidad celulares, para la activación de quinasas que fosforilan lípidos o proteínas, y para la inducción de cambios transcripcionales que participan en respuestas proliferativas y/o de desarrollo (100).

La actividad de las proteínas Rho y Rac se ha asociado también a procesos de transformación celular y oncogénesis, sobre todo por servir como coadyuvantes de las rutas de otros oncogenes, como *ras*, o las versiones transformantes de receptores acoplados a proteínas G (100).

En las células eucariotas con movilidad, la actina del citoesqueleto controla los movimientos mediante la emisión de filopodios, la extensión por lamelipodios y la fijación al sustrato para desplazarse por tracción (101). Cdc42, Rac y Rho se activan en cascada y controlan secuencialmente estas etapas (102). Los filamentos de actina se unen a la región carboxiterminal de las proteínas ERM (*e*zrina, *r*adixina o *m*oesina), y éstas contactan con la membrana a través de su región aminoterminal. CD44 es una de las proteínas de membrana que co-inmunoprecipita con las ERM, por lo que parece que la conexión de las ERM con la membrana se realiza por el dominio citoplasmático de CD44 (103). La conexión entre CD44 y la actina podría deberse a la activación de las ERM, que en situación "relajada" tienen suprimidas estas funciones de interconexión a causa de las asociaciones homotípicas o

heterotípicas entre las partes carboxiterminal y aminoterminal de la propia proteína ERM. Rho podría ser el encargado de regular la activación de las ERM y la unión a CD44, pero se desconoce el mecanismo responsable.

Señalización por Integrinas, Rho GTPasas y microdominios lipídicos de membrana (*rafts*)

Recientemente se ha comprobado la existencia de rutas de señalización, todavía desconocidas, que acoplan cambios citoesqueléticos con la activación génica (104). Por este motivo, la manipulación farmacológica de rutas que afectan al reciclaje citoesquelético es una vía muy activa de investigación para abordar diversos tipos de enfermedades.

Las **integrinas** regulan el citoesqueleto por medio de interacciones con proteínas como talina y a través de la regulación de vías de señalización intracelular. Dichas vías gobiernan los procesos de migración celular, proliferación, expresión génica y supervivencia. Por lo tanto, la señalización por integrinas es un fenómeno de considerable relevancia para el cáncer y su diseminación metastásica.

Dados sus amplios efectos en citoesqueleto, tráfico de membranas y expresión génica, las GTPasas **Rac1 y Cdc42** (de la familia Rho) pueden considerarse como coordinadoras centrales de redes de señalización intracelular. Rac es un mediador fundamental de la migración celular. Induce la formación de lamelipodios y *ruffles* (ondulaciones de membrana), promueve la endocitosis y la exocitosis, la expresión génica y la progresión del ciclo celular. Entre los efectores de Rac se encuentran Pak, MLK y WAVE/SCAR (105,106). Cdc42 también está implicado en migración, posiblemente mediante la formación de filopodios a través de sus efectores WASP y N-WASP y también mediante efectos en la polarización celular (107,108). Cdc42 regula también la expresión génica y el ciclo celular. Además, estas GTPasas han sido implicadas en la transformación cancerosa (109).

Recientemente se ha demostrado que Rho y Rac se localizan en **caveolas** (110), que constituyen un tipo de microdominios lipídicos de membrana o **lipid rafts**. Son regiones de la membrana plasmática ricas en colesterol, esfingolípidos y, en algunos casos, proteínas de membrana como caveolinas o flotilinas (111). Su composición, comportamiento y función no se conoce aún totalmente (112), y existe más de un subtipo, aunque frecuentemente son tratados como una sola categoría. Los *rafts* representan un importante papel en la transducción de señales, probablemente al aglutinar un gran conjunto de moléculas señalizadoras en un espacio físico reducido.

ANGIOGÉNESIS, LINFANGIOGÉNESIS Y METÁSTASIS.

La angiogénesis, o producción de nuevos microcapilares asociados al tumor, es otra de las etapas limitantes para la formación de metástasis y la expansión del tumor primario. Esta red de microvasos representa un papel esencial en la progresión tumoral ya que aporta el oxígeno y nutrientes esenciales para la supervivencia de las células tumorales y proporciona una vía de diseminación hacia otros órganos y tejidos. La generación de nuevos capilares es el resultado del balance entre señales positivas y negativas entre distintos tipos de moléculas producidas por las células del tumor y las del huésped. Se conocen más de dos docenas de efectores positivos de la angiogénesis, y otros tantos negativos. Algunas de estas señales son mediadas por factores solubles y sus receptores. Ejemplos de iniciadores de la angiogénesis son el VEGF-A (*Vascular Endothelial Growth Factor*) y los FGF (*Fibroblastic Growth Factor*), los cuales se unen respectivamente a receptores tirosinquinasa transmembranarios presentes en las células endoteliales de los vasos adyacentes al tumor. Uno de los inhibidores de angiogénesis mejor caracterizados es la trombospondina-1 (TSP-1) (113). Este inhibidor se une a CD36, un receptor transmembranario acoplado a tirosin-quinasa intracelulares de la familia Src, e induce la muerte por apoptosis de forma selectiva en las células endoteliales activadas que constituyen la red de microvasos que se expande en torno a la masa tumoral (114). Uno de los aspectos más relevantes, que aún está por definir, es el mecanismo molecular responsable de la acción selectiva de TSP-1 sobre el endotelio tumoral (115).

En la progresión tumoral, la adquisición del fenotipo angiogénico, del que resulta la producción de nuevos vasos, constituye una etapa crítica y decisiva, puesto que es limitante del crecimiento del tumor y la diseminación. La mayoría de los tumores recurren a la sobreexpresión de moléculas proangiogénicas mediante alteraciones en la regulación transcripcional de VEGF (a consecuencia de la hipoxia, o de la expresión de determinados oncogenes como *ras*). Por otra parte, la mayoría de los tumores adquieren mutaciones del gen supresor p53 a lo largo de la progresión. La pérdida de función de p53 provoca la disminución de trombospondina-1, lo que libera a las células endoteliales del efecto inhibitorio de esta molécula (116).

Por otra parte, en el equilibrio entre la producción y la inhibición de la formación de nuevos vasos también intervienen la señalización por integrinas, las metaloproteasas y sus inhibidores (TIMP), o las serinproteasas como la plasmina.

Recientemente, se han descrito factores de crecimiento específicos de los vasos linfáticos adyacentes al tumor, cuya actividad origina una linfangiogénesis. VEGF-C y VEGF-D pertenecen a la misma familia de los factores angiogénicos efectivos para los capilares sanguíneos (VEGF-A). Actualmente se conocen aspectos importantes del mecanismo de la angiogénesis tumoral; sin embargo, el mecanismo de la linfangiogénesis es en gran medida desconocido.

ORGANOESPECIFICIDAD DE LAS METÁSTASIS.

El microentorno del huésped puede inducir o frenar la capacidad metastásica de las poblaciones tumorales, de modo que tiene un papel determinante en la progresión (117-119), tanto desde el punto de vista de la invasión como también del de la proliferación o la apoptosis (120,121). Las células tumorales establecen comunicaciones con el microentorno a través de integrinas, citoquinas, receptores de citoquinas y proteasas. Los factores del microentorno pueden inhibir la propagación y la progresión de determinadas subpoblaciones tumorales mediante la promoción de su apoptosis; la eliminación de las células puede tener lugar en el torrente circulatorio o una vez ya están diseminadas (122). Por el contrario, existen señales endocrinas y paracrinas del entorno que pueden favorecer la progresión tumoral y la formación de metástasis (123) en un determinado órgano. Las influencias del huésped pueden también provocar la entrada de las células tumorales en un estado de latencia, hasta que las condiciones les sean favorables.

En cierta medida, estas tres opciones son las directrices de la organoespecificidad de las metástasis.

La respuesta de determinadas células a citoquinas órgano-específicas (124) una vez dichas células están ya diseminadas y ubicadas en un órgano concreto, favorece la progresión tumoral. Este nuevo tipo de resistencia a la apoptosis fue descrito al identificar un nuevo gen denominado CC3 involucrado en metástasis (125). También el microentorno contribuye de forma decisiva a la angiogénesis: la producción de determinadas citoquinas específicas de un órgano en concreto (o producidas por las células inflamatorias residentes) inducen (como en el caso de IL-1) o inhiben ($TGF\beta$) la expresión de una potente molécula pro-angiogénica como es IL-8 por parte de las células tumorales (121).

INMUNOLOGÍA

La hipótesis simplista, formulada hace varias décadas, según la cual los tumores que crecen y amenazan la supervivencia del huésped son aquellos que no han sido erradicados por el sistema inmune, sigue siendo cierta hoy en día, aunque con algunos matices que indican que en este “fallo” participan tanto el tumor como el huésped.

Las células tumorales presentan un amplio repertorio de antígenos: algunos son propios del tejido donde se ha originado el tumor primario, y otros son nuevos, que aparecen como consecuencia de las mutaciones adquiridas (el número de mutaciones se estima en más de 11000 por célula tumoral, y podrían generar la expresión de nuevos antígenos). Algunos de estos antígenos son específicos de las células tumorales y se denominan neoantígenos, mientras que otros son llamados *Tumor Associated Antigens* (TAA) porque se encuentran sobreexpresados en las células del tumor, aunque también pueden presentarse en los tejidos normales.

Diversos péptidos de los antígenos tumorales son presentados por las moléculas de clase I del sistema HLA (*Human Leucocyte Antigen*) en la superficie celular. Los complejos HLA-péptido están bajo la vigilancia del sistema inmune. La respuesta inmunológica celular consiste en dos funciones: una efectora de la citotoxicidad y una colaboradora (*helper*). La función efectora de la citotoxicidad es llevada a cabo por los linfocitos T que contienen el marcador CD8 y reconocen a los péptidos presentados por las moléculas HLA de clase I. La función colaboradora es llevada a cabo por los linfocitos T que contienen el marcador CD4, y está restringida a las moléculas de clase II del sistema MHC. Algunos antígenos TAA han sido utilizados con éxito como vacunas (por ejemplo, el epítipo MAGE) porque pueden provocar el rechazo del tumor por parte del sistema inmune del huésped (126).

Sin embargo, el sistema inmune no siempre es tan eficaz, ya que frecuentemente las células tumorales eluden los mecanismos de vigilancia del sistema inmune, porque son tolerados por éste, o bien porque no responde a esos antígenos (los ignora o falla en alguna etapa del proceso de respuesta). Los mecanismos moleculares subyacentes a este escape o fallo se pueden agrupar en dos categorías: la de los debidos a la inestabilidad genética inherente a las células tumorales, y la pérdida de expresión de moléculas co-estimuladoras (B7-1/CD80; B7-2/CD86 y CD40), la inducción de la actividad supresora celular, o la producción de sustancias inmunoinhibitorias (como por ejemplo IL-10 y TGF β) u otras estrategias inmunorreguladoras desarrolladas por el huésped.

Para las células tumorales, la inestabilidad genética representa una ventaja porque permite cambios en la expresión de determinados antígenos, en su procesamiento y en su maquinaria de presentación a los linfocitos T. Estos últimos incluyen a las moléculas del complejo de histocompatibilidad (MHC-clase I, frecuentemente ausentes en diversos tumores), a las subunidades transportadoras del TAP (*Transported Associated with Antigen Processing*) y a las subunidades del proteasoma (127).

El estudio de la inmunotolerancia frente al tumor por parte de los linfocitos T del huésped se ha realizado sobre todo en melanomas, y se ha demostrado que los distintos mecanismos mencionados contribuyen a ese resultado. En primer lugar, muchos de los antígenos presentes en el suero de pacientes con melanoma son antígenos de diferenciación como MART-1, gp100, tirosinasa u otros, frente a los cuales presentan tolerancia los linfocitos T periféricos. Dicha tolerancia es una falta de respuesta inmune, dado que las subpoblaciones CTLA-4 responsables de desencadenar dichas respuestas interactúan con miembros de la familia de co-estimuladores B7 inhibiendo la activación de otras subpoblaciones T de linfocitos citotóxicos. Este es el caso de B7H descubierto recientemente, que promueve la apoptosis de los linfocitos T, induciendo a la sobreexpresión de FAS y su ligando (CD95L) (que actúa como mediador del "contraataque" (128)) e induciendo asimismo IL-10.

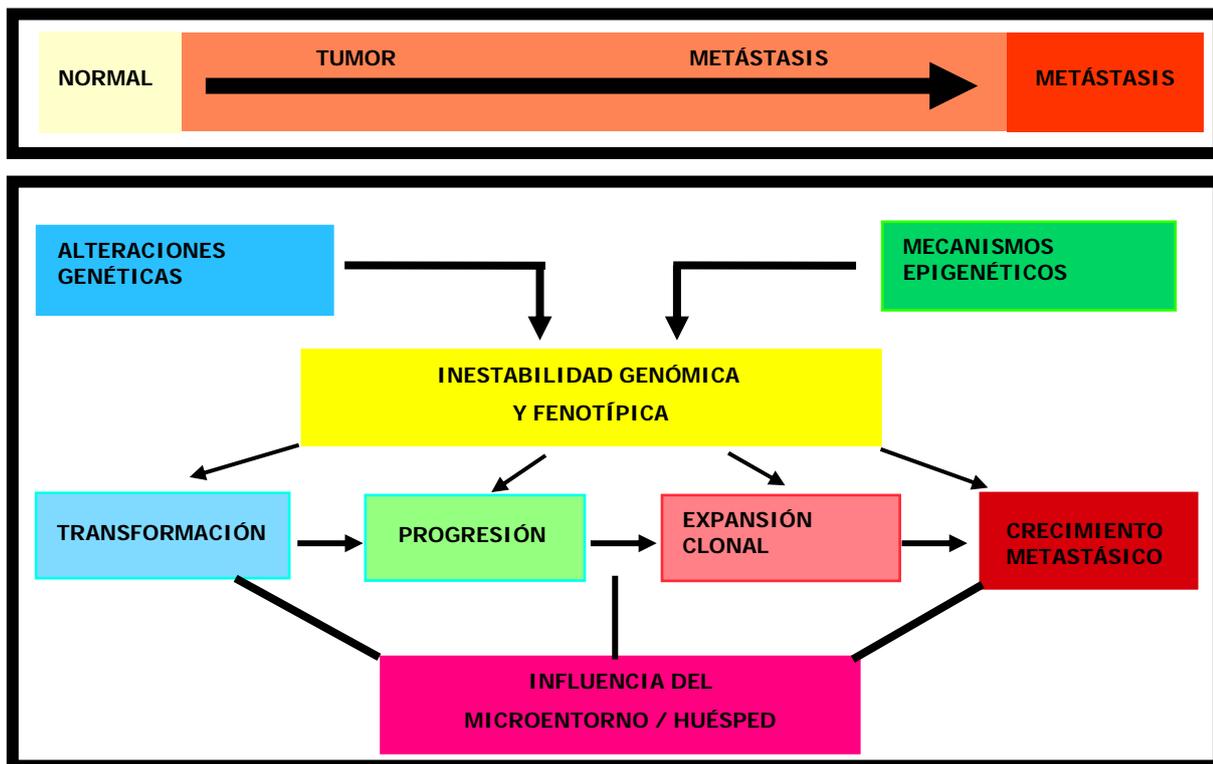


Figura 1.10.- Esquema de la influencia de las diferentes fuentes de variación en el proceso de aparición de metástasis. Tanto las alteraciones genéticas de las propias células como diversos mecanismos epigenéticos provocan un cierto grado de inestabilidad en las células, que se transforman en tumorales. Esta misma inestabilidad, junto con las características del microentorno del huésped, afecta a las sucesivas etapas de la progresión tumoral, tanto favoreciendo como desfavoreciendo este fenómeno. El que una célula devenga metastásica es, por tanto, el fruto del conjunto de todas estas influencias.

1.6.- PERSPECTIVA FUTURA

A pesar de todo lo expuesto, aún se desconocen muchos aspectos acerca de los cambios en la expresión génica que confieren las alteraciones celulares características de las células metastásicas. Por ejemplo: **¿Cuáles son los genes más relevantes? ¿La expresión de cuántos de ellos es imprescindible para la formación de metástasis? ¿Podrían genes distintos conferir las mismas propiedades celulares? ¿Cómo es la organoespecificidad de las metástasis a nivel genético? ¿Cuál es la contribución del huésped en los cambios de expresión génica de las poblaciones metastásicas? ¿Existen genes directores del encadenamiento de las etapas del proceso metastásico? ¿Cuál es la contribución de la inestabilidad genómica al proceso metastásico?**

Para abordar estas preguntas, debe tenerse en cuenta que el proceso metastásico está condicionado, en primer lugar, por las ganancias o pérdidas de expresión génica acaecidas durante la progresión neoplásica, y es, por otro lado, el resultado de la activación o represión de un número indeterminado de genes específicos involucrados en cada una de las etapas (revisión de los conceptos básicos en metástasis por Engers (129)).

Una de las maneras de abordar el estudio molecular y celular de los eventos críticos en el proceso de invasión y desarrollo de las metástasis, es la búsqueda e identificación de genes asociados al fenotipo metastásico. Por tanto, puesto que una de las características básicas que diferencian a las células tumorales que adquieren un fenotipo metastásico de las que no lo adquieren es la expresión diferencial de genes diversos, en el presente trabajo se plantea la siguiente

HIPÓTESIS

En las células tumorales, la expresión diferencial de genes asociados al fenotipo metastásico:

Puede ser detectada mediante el método de RAP-PCR.

Puede afectar a genes que participen en etapas diversas del proceso metastásico (invasión, migración, angiogénesis,...)

La comprobación de esta hipótesis se fundamentará en los siguientes objetivos:

- 1.- Utilizando el método RAP-PCR en modelos tumorales que compartan un acervo genético común, buscar e identificar genes diferencialmente expresados entre poblaciones metastásicas y no metastásicas
- 2.- Relacionar la función biológica de los genes detectados, si es conocida, con sus posibles implicaciones en el fenotipo metastásico.
- 3.- Estudiar la influencia de algunos de ellos sobre el fenotipo metastásico.

2.- DETECCIÓN, MEDIANTE RAP-PCR, DE GENES CANDIDATOS A PARTICIPAR EN EL PROCESO METASTÁSICO DEL CARCINOMA MAMARIO

2.1.- MATERIAL Y MÉTODOS

2.1.1.- Descripción de los modelos celulares.

Modelo de adenocarcinoma de mama murino (ratones MXT).

- **MXT salvaje(S)**: línea celular parental procedente de un tumor inducido químicamente (con uretano) en ratones BDF-1. Se trata de células sensibles a estrógenos y progesterona, tumorógenas en hembras adultas BDF-1 y en ratones desnudos; tienen capacidad invasiva, pero raras veces originan metástasis de manera espontánea (es decir, cuando se inyectan en la mama), y solo ocasionalmente de manera experimental (es decir, cuando se inyectan intravenosamente). Estas células constituyen una población genéticamente heterogénea.

- **MXT- E2**: clon seleccionado a partir de la línea parental. Está constituido por células dependientes del aporte de estradiol para su crecimiento. Es un clon tumorígeno en hembras adultas BDF-1 y en ratones desnudos.

- **MXT-c1**: clon aislado por dilución límite *in vitro* de las células MXT-S. Constituido por células cuyo crecimiento es independiente del aporte hormonal, es tumorígeno en hembras adultas BDF-1 y en ratones desnudos, invasivo y moderadamente metastásico en pulmón cuando se implanta ortotópicamente en mama. Produce esporádicamente metástasis ganglionares y óseas.

- **MXT-C1.1**: clon seleccionado a partir de un nódulo metastásico en el pulmón de ratones a los que se habían inyectado células del clon c1. Sus células son hormonoindependientes y originan tumores en hembras adultas BDF-1 y en ratones desnudos. Es extraordinariamente invasivo y muy metastásico en pulmón; produce un gran número de metástasis espontáneas o experimentales.

- **MXT-B2**: clon seleccionado a partir de un nódulo metastásico en el pulmón de ratones a los que se habían inyectado células de la línea parental. Sus células son hormonoindependientes, y originan tumores en hembras adultas BDF-1 y en ratones desnudos. Es un clon invasivo y muy metastásico en pulmón, especialmente cuando las células son inoculadas por vía endovenosa.

- **MXT-clones 1-15**: clones seleccionados por dilución límite *in vitro* a partir de la línea parental.

Modelo de adenocarcinoma de mama humano (MDA-MB 435)

- **MDA-MB-435 P**: línea parental aislada de un exudado pleural de una paciente con cáncer de mama. Es hormonoindependiente y tumorigénica en ratones desnudos y «scid». Produce metástasis pulmonares y linfáticas cuando es implantada ortotópicamente en mama. Consiste en una población genéticamente heterogénea.

- **MDA-MB-435 B:** línea celular establecida a partir de una metástasis cerebral espontánea de un ratón inoculado ortotópicamente con la línea parental. Poco metastásica y poco invasiva.

- **MDA-MB-435 Lung2:** línea celular establecida a partir de una metástasis pulmonar espontánea de un ratón inoculado ortotópicamente con la línea parental, y enriquecida de *in vitro* a *in vivo* en sucesivos pases. Es muy metastásica y muy invasiva.

- **MDA-MB-435 Liver, LN:** variantes IRO en actual caracterización.

- **MDA-MB-435-L clones 1-18:** clones seleccionados por dilución límite *in vitro* a partir de la línea parental.

2.1.2.- Cultivo de las células: condiciones de crecimiento y recogida de pellets

Salvo que se especifique otra cosa, todas las variantes celulares que se han cultivado en el presente trabajo han crecido en medio mínimo esencial Dulbecco (DMEM) y medio Ham F-12 (en relación 1:1), con un suplemento de un 5% de suero fetal bovino inactivado por calor, piruvato sódico 100mM, L-glutamina 200mM (Gibco, Grand Island, NY, EEUU). Las células crecen adhiriéndose a la superficie interna de frascos de plástico, que se incuban a 37 °C en una estufa de cultivos, con ambiente humidificado, con un 95% de aire y un 5% de CO₂.

Todas las células se sometieron a una prueba de detección de *Mycoplasma sp*, que se realizó con el equipo Gene-Probe Mycoplasma (Gene-Probe Inc., San Diego, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para despegar las células de la superficie de plástico, primero se lavaban dos veces con PBS 1X y después se sometían a la acción de una solución de tripsina-EDTA (0,05% de tripsina y 0,2 g/L de EDTA) (Gibco BRL) diluida al 10% con PBS, sin iones Ca²⁺ ni Mg²⁺, a una temperatura de 37 °C. La actividad de la tripsina se bloqueaba con el mismo volumen de medio de cultivo. Las células resuspendidas se centrifugaban, para originar un botón celular (*pellet*), que después se empleaba para la obtención de RNA o DNA, de manera inmediata o tras una previa congelación para conservarlo.

Además, para conservar las células durante períodos largos de tiempo, los botones celulares se obtenían cuando las células se encontraban en crecimiento exponencial, y se recogían en medio de congelación, que es el mismo que el que se usaba para cultivo, con la diferencia de que el suero fetal bovino se encontraba al 20% (en vez de al 5%) y que se añadía un 10% de DMSO. Las células se congelaban lentamente utilizando un recipiente con isopropanol (Nalgene Cryo 1 °C *freezing container*) que se introducía en un congelador a -80 °C, y posteriormente se conservaban en N₂ líquido.

El recuento celular que se hace en diversos experimentos del presente trabajo, en que se requiere conocer el número de células utilizadas, se realiza añadiendo azul tripano a un volumen conocido de suspensión celular (relación 1:1). Las células no viables se tiñen, y

se cuentan las no teñidas (viables) en una cámara Neubauer® (Brand) de 0,1 mm de profundidad.

2.1.3.- Obtención de mRNA.

El material de partida para la obtención de mRNA han sido *pellets* de las células cultivadas.

El principio del método es la cromatografía de afinidad: la utilización de matrices de celulosa a las que están unidos oligonucleótidos de desoxitimidina de hasta 30 nucleótidos permite la retención del RNA poliadenilado

En general, en los dos métodos utilizados, tras la lisis celular, se añade la celulosa-oligo(dT). Posteriormente, se eliminan los restos celulares, así como el RNA no poliadenilado, mediante diversos lavados. Por último, se eluye el RNA poliadenilado.

Se han utilizado los equipos Micro-Fast Track™ (Invitrogen) y Mini RiboSep™ (Becton Dickinson), siguiendo siempre las indicaciones del fabricante. En el primer caso, partiendo de menos de $5 \cdot 10^6$ células, se obtenían cantidades pequeñas de RNA poliadenilado, pero suficientes para poder someterlas a transcripción inversa y posterior reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El segundo equipo se ha utilizado para la obtención de cantidades superiores de RNA poliadenilado (alrededor de 30-40 μg , a partir de *pellets* con, al menos, $30 \cdot 10^6$ células), que se han empleado para someterlas a pruebas Northern.

Micro-Fast Track™ (Invitrogen). Las células son lisadas en una solución amortiguadora (NaCl 200 mmol/L, Tris pH 7,5 200 mmol/L, MgCl_2 1,5 mmol/L) que contiene un detergente (SDS 2%) y un degradante de RNAsa y proteínas; la reacción se produce a 45 °C. La concentración de NaCl del lisado se ajusta a 0,5 mol/L mediante una solución de 5 mol/L de NaCl. Se añaden oligonucleótidos de desoxitimidina de 20-30 bases de longitud unidos a celulosa. A continuación, la celulosa se limpia de DNA, proteínas degradadas y restos celulares mediante lavados con una solución amortiguadora de 500 mmol/L de NaCl (más 10 mmol/L Tris-HCl pH 7,5). Después, la celulosa se limpia de RNAs no poliadenilados con una solución amortiguadora de 250 mmol/L de NaCl (más 10 mmol/L Tris-HCl pH 7,5). Por último, el RNA poliadenilado se eluye mediante el uso de una solución de Tris 10 mmol/L, pH 7,5. Para precipitar este RNA, se añade glucógeno (2g/L), acetato sódico (2 mol/L) y etanol absoluto, y se congela a -80 °C. La recuperación definitiva del RNA poliadenilado se consigue centrifugando la mezcla, aspirando el etanol y resuspendiendo el precipitado con la solución que sirvió para eluir.

Mini Ribo-Sep (Beckton Dickinson). Las células se lisan con una solución amortiguadora que contiene un detergente (SDS) al que se añade proteinasa K (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La solución de lisis se añade al pellet antes de que se descongele, y se homogeneiza mediante

aspiración/expulsión a través de agujas de pequeño calibre para romper el DNA existente. Tras una incubación de 2 horas a 45 °C, la concentración de NaCl del lisado se ajusta a 0,5 mol/L mediante una solución de 5 mol/L de NaCl. Se añade la celulosa con oligonucleótidos de desoxitimidina y se incuba mezclando bien. A continuación, se centrifuga para después eliminar el sobrenadante y añadir una solución amortiguadora de 500 mmol/L de NaCl (y 10 mmol/L Tris-HCl pH 7,5), con la que se lava varias veces la celulosa. Por último, el RNA poliadenilado se eluye mediante el uso de una solución de Tris 10 mmol/L, pH 7,5. Para precipitar este RNA, se añade acetato sódico (3 mol/L) y etanol absoluto, y se congela a -80 °C. La recuperación definitiva del RNA poliadenilado se consigue centrifugando la mezcla, aspirando el etanol y resuspendiendo el precipitado con una solución adecuada.

2.1.4.- RNA Arbitrarily Primed (RAP)-PCR.

El método RAP-PCR consiste en dos reacciones consecutivas: una transcripción inversa del mRNA utilizando un cebador aleatorio y una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en que se emplea el mismo cebador más otro cualquiera (o bien solo el primer cebador).

2.1.4.1.- Transcripción inversa.

En general, no es imprescindible emplear mRNA, pero el hecho de que la gran mayoría del RNA de una célula sea ribosómico permite sospechar que, al usar RNA total, muchos de los fragmentos de cDNA que se obtengan finalmente procederán de rRNA. Por este motivo, en el presente trabajo se ha procurado emplear un RNA enriquecido en mRNA (si bien la existencia de rRNA es inevitable).

Como cebador, puede utilizarse cualquier fragmento de DNA, de secuencia existente o inventada. En este caso, se han empleado un fragmento de la secuencia del gen de p53: 5'- ATGGCGGGAGGTAGACTGAC-3' (denominado 10DN), y otro del gen de VEGF 5'- TTCTGTATCAGTCTTTCCTGGTGAG -3'.

Dada la facilidad con que el RNA puede resultar degradado, se añade a la reacción un inhibidor de RNAsas (Boehringer Mannheim, Alemania).

Por otro lado, para dificultar la formación de estructuras secundarias del RNA, se añade también ditioneitol (DTT) 0,1 mol/L.

Los componentes de la reacción se completan con trifosfodesoxirribonucleótidos (dNTPs) y con el tampón adecuado, incluido con la enzima transcriptasa inversa de Moloney (M-MuLV, Gibco, Eggenstein, Alemania).

En resumen, la mezcla de reacción típica que se ha empleado para la transcripción inversa ha sido:

Componentes	Volumen por muestra (μL)	Concentración final
mRNA (100 ng)	2,4	
cebador (100 $\mu\text{mol/L}$)	0,1	0,5 $\mu\text{mol/L}$
“Tampón 5X”		“1X”
Tris-HCl (pH 8,3) 250mmol/L	4	Tris-HCl (pH 8,3) 50 mmol/L
KCl 375 mmol/L		KCl 75 mmol/L
MgCl ₂ 15 mmol/L		MgCl ₂ 3 mmol/L
DTT (0,1 mol/L)	2	10 mmol/L
dNTPs (1 mmol/L)	10	0,5 mmol/L
Inhibidor de RNAsas (0,25-1,25 U/ μL)	0,5	0,125-0,625 U
Transcriptasa inversa (200 U/ μL)	1	200 U
Vol. final	20	

Los volúmenes totales de mezcla de reacción se calculan multiplicando por (n+1) los volúmenes por muestra (siendo n el número de muestras).

El mRNA se calienta a 65 °C durante 5 minutos para eliminar las estructuras secundarias, y, a continuación, se coloca en hielo. La mezcla de reacción se alicuota en los tubos en que se encuentra el mRNA, se mezcla bien y se incuban a 37 °C durante una hora. Posteriormente, se calientan a 95 °C durante 5 minutos para inactivar las enzimas. El producto se guarda a -80 °C si no se va a usar inmediatamente.

2.1.4.2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Utilizando como muestra el producto de la transcripción inversa, se lleva a cabo una PCR para delimitar los fragmentos de cDNA y amplificarlos hasta hacerlos detectables. Para ello, se emplean como cebadores, por un lado, el mismo que se utilizó en la transcripción inversa (10DN) y además otro cualquiera, en este caso, el denominado 1UR: 5'-AGACTGCCTTCCGGGTCCT-3'.

Por otro lado, para facilitar su detección, se añade un trifosfodesoxirribonucleótido marcado radiactivamente (en concreto, con [$\alpha^{33}\text{P}$]dATP), además de los no marcados.

La mezcla de reacción típica que se ha empleado ha sido:

Componentes	Volumen por muestra (μL)	Concentración final
cDNA	2,5	
cebador 10DN (100 μmol/L)	0,25	1 μmol/L
cebador 1UR (100 μmol/L)	0,25	1 μmol/L
“Tampón 10X” (Roche) Tris-HCl 100 mmol/L KCl 500 mmol/L MgCl ₂ 15 mmol/l	2,5	“1X” Tris-HCl 10 mmol/L KCl 50 mmol/L MgCl ₂ 1,5 mmol/L
dNTPs (1 mmol/L)	2,5	0,1 mmol/L
[α- ³³ P]dATP(Amersham 0,04Ci/L)	0,1	0,004 □Ci
<i>Taq</i> polimerasa (5U/μL) (Roche)	0,25	1,25 U
H ₂ O	16,65	
Vol. final	25	

Utilizando el fragmento de VEGF (5'-TTCTGTATCAGTCTTTCCTGGTGAG-3') como único cebador, se prepara una mezcla de reacción similar

Componentes	Volumen por muestra (μL)	Concentración final
cDNA	2,5	
cebador (100 μmol/L)	0,5	2 μmol/L
“Tampón 10X” (Roche) Tris-HCl 100 mmol/L KCl 500 mmol/L MgCl ₂ 25 mmol/l	2,5	“1X” Tris-HCl 10 mmol/L KCl 50 mmol/L 3,7 mmol/L
dNTPs (1 mmol/L)	1,25	50 μmol/L
[α- ³³ P]dATP(Amersham 0,04Ci/L)	0,1	0,004 μCi
<i>Taq</i> polimerasa (5U/μL) (Roche)	0,2	1 U
H ₂ O	14,25	
Vol. final	25	

Los volúmenes totales de mezcla de reacción se calculan multiplicando por (n+1) los volúmenes por muestra (siendo n el número de muestras).

Una vez alicuotada la mezcla de reacción en tubos de microcentrífuga de 0,5 mL, se añaden las correspondientes muestras de cDNA y se someten a las siguientes condiciones de temperatura:

95 °C	30 s	
94 °C 55 °C 72 °C	1 min 45 s 1 min	35 veces
72 °C	5 min	

en el caso de 10DN y 1UR

O bien

95 °C	30 s	
94 °C 42 °C 72 °C	30 s 45 s 1,5 min	35 veces
72 °C	5 min	

en el caso de VEGF

Las reacciones se han llevado a cabo en termocicladores MiniCycler o PTC-100 (MJ Research Inc.).

2.1.5.- Electroforesis en gel de secuenciación.

Condiciones del gel

Componentes	Concentración
Tris-HCl -----	89 mmol/L
Borato -----	89 mmol/L
EDTA -----	2 mmol/L
Urea -----	8 mol/L
Acrilamida:bisacrilamida (29:1) (40%) -----	6 %

Tratamiento y carga de la muestra: a 5 µL del producto de PCR se añaden 10 µL de DLB ("denaturing loading buffer"), que contiene xilencianol (0,05%, p/v) y azul de bromofenol (0,05%, p/v), además de formamida (95%, v/v) y 20 mmol/L de EDTA. La dilución se calienta a 100 °C durante 3 minutos, y luego se coloca en hielo hasta el momento de cargar 3 µL en el gel.

Condiciones de la electroforesis: a una potencia fija de 55 W, se programan unos máximos de voltaje de 2000 V y de amperaje de 150 mA, y se hace pasar la corriente eléctrica por el gel hasta que el azul de bromofenol se encuentra hacia el final (2-3 horas).

Los cristales se separan, el gel se despegar del cristal adhiriéndolo a un papel Whatmann, y posteriormente se seca mediante la aplicación simultánea de vacío y calor.

Una película AGFA Curix se expone al gel, y se revela después de al menos 18 horas.

Aislamiento de los cDNAs separados por electroforesis.

Una vez detectadas en la película las bandas que pueden resultar interesantes para el estudio, se superponen exactamente el gel y la película y, por transiluminación, se identifican sobre el gel dichas bandas. A continuación, se recortan con un bisturí estéril y se introducen en tubos de microcentrífuga con 20 μL de agua bidestilada. Para facilitar la resuspensión del cDNA, se calienta 20 minutos a 65 °C

Reamplificación del cDNA.

Para obtener una mayor cantidad de material que poder someter a clonación en plásmidos, se realiza la misma PCR mediante la cual se obtuvo, excepto que no se utilizan nucleótidos radiactivos y solo se programan 25 ciclos.

2.1.6.- Clonación de los fragmentos de cDNA reamplificados.

Para facilitar su secuenciación, las bandas de cDNA recortadas y reamplificadas se han clonado utilizando el equipo Original TA Cloning (Invitrogen).

Puesto que en la PCR de reamplificación de las bandas se ha utilizado polimerasa *Taq*, los productos tienen un nucleótido de adenina extra en el extremo 3'. Esta propiedad característica de la actividad de la *Taq* se aprovecha para ligarlos a plásmidos especialmente preparados que tienen extremos 3' con un nucleótido de timina protuberante. La reacción de ligación se lleva a cabo en las siguientes condiciones:

Componente	Volumen (μL)
Producto de PCR	1 a 6
Tampón de ligación 10X *	1
Vector pCR TM 2.1 (25 ng/ μL)	2
T4 DNA ligasa	1
H ₂ O estéril	hasta 10
Volumen final	10

*Composición del tampón de ligación 10X: Tris-HCl pH 7,5 60 mmol/L, MgCl₂ 60 mmol/L, NaCl 50 mmol/L, albúmina sérica bovina 1 g/L, β -mercaptoetanol 70 mmol/L, ATP 1 mmol/L, ditiotreitól 20 mmol/L, espermidina 10 mmol/L.

La mezcla de reacción se incuba en un termociclador a 14 °C durante 16 horas.

El producto de la ligación se pone en contacto con las bacterias (INV α F') que suministra el fabricante, siguiendo sus instrucciones, para lograr la incorporación del plásmido con el inserto al interior de las bacterias y, por consiguiente, su transformación.

Después de hacerlas crecer a 37 °C en placas de agar-LB con ampicilina (50mg/L) y X-Gal durante 18 horas, y pasarlas después a 2-8 °C durante al menos 2 horas, las colonias formadas toman color azul, si no han incorporado plásmidos o estos son sin inserto, y blanco si el plásmido incorporado tiene inserto.

Se seleccionan colonias blancas y se siembran por separado, cada una en 4 mL de LB líquido con ampicilina (50 mg/L). Cuando han crecido ligeramente, se ponen 10 µL en un tubo de microcentrífuga de 0,5 mL, se diluyen 1/10 con agua bidestilada, se calienta todo a 100 °C durante 10 minutos y luego se centrifuga 5 minutos a 15000g. El sobrenadante se emplea como sustrato para una PCR igual a la de reamplificación. Si el producto obtenido es del mismo tamaño que la banda que se quería clonar, se considera que la transformación ha sido buena y se deja crecer más el cultivo bacteriano, para luego obtener el plásmido.

La purificación del plásmido se realiza con el equipo WizardTM Minipreps (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras centrifugar los cultivos bacterianos, el *pellet* se resuspende con una solución de resuspensión (Tris-HCl (pH 7,5) 50 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, RNAsa A 100 µg/mL) y las bacterias se rompen mediante una solución de lisis (NaOH 0,2 mol/L, SDS 1%); por último, se añade una solución de neutralización (acetato potásico pH 4,8 1,32 mol/L) antes de centrifugar. El sobrenadante se mezcla con una resina de purificación (Promega) y se introduce con una jeringa en las columnas que contiene el equipo. Luego se hace pasar del mismo modo una solución de lavado (NaCl 117 mmol/L, Tris-HCl pH 7,5 11,7 mmol/L, EDTA 2,9 mmol/L, etanol 58% v/v). AL final, se aplican a la columna 50 µL de TE para eluir el plásmido por centrifugación (14000g durante 20 s).

Una vez obtenida una solución con el plásmido, este se digiere con la enzima Eco RI, que corta el inserto. Los productos de la digestión se separan electroforéticamente en un gel de agarosa (1%), y la banda correspondiente al inserto se recorta del gel, y se purifica mediante el equipo GeneClean II® (Bio 101 Inc.), según las instrucciones del fabricante. El trozo de gel recortado se calienta a 55 °C para disolver la agarosa, y se añade NaI y una suspensión de partículas de sílice (Glassmilk®) a la que se adhiere el DNA. Tras varios lavados de la matriz, se eluye el DNA con H₂O.

La banda purificada se empleará como sonda, previo marcaje radiactivo, en hibridaciones en ranura o Northern.

2.1.7.- Secuenciación de los cDNAs

Utilizando como muestra el plásmido con el inserto, se realiza la secuenciación del inserto con el equipo AmpliCycleTM (Perkin Elmer), que emplea el método enzimático de los didesoxinucleótidos.

Este método se basa en la interrupción de la síntesis de DNA que provocan los 2',3'-trifosfodidesoxinucleótidos (ddNTPs) en el punto en que se incorporan a una cadena que crece por acción de una DNA-polimerasa. Así, cuando a una mezcla de reacción que contiene los

cuatro trifosfodesoxinucleótidos (dNTPs) se añade un ddNTP, los productos de la extensión son una serie de fragmentos de todos los tamaños posibles que terminan en ese ddNTP en concreto, partiendo de una determinada secuencia cebadora. Utilizando cuatro mezclas de reacción distintas (una por cada ddNTP), y separando electroforéticamente los productos en carriles contiguos, se originará una escala de bandas de tamaños distintos, que se corresponden con todas las posiciones posibles y se pueden “leer” sucesivamente para formar una secuencia.

En el método de AmpliCycle™ se utilizan ciclos de temperatura, como en una PCR, para conseguir una cierta amplificación en sucesivas extensiones, y se añade además un dNTP marcado radiactivamente para permitir la visualización de los productos.

Como cebador se utiliza una corta secuencia del virus M13, que está incluida en la del plásmido pCR 2.1.

Una mezcla de reacción típica es:

Componente	Volumen (μL)
Muestra (plásmido)	1
cebador M13 (20 μmol/L)	1
“Cycling Mix” (10X)*	4
[α ³³ P]dATP	0,5
H ₂ O	22,5
Volumen final	30

*Composición de esta mezcla: DNA-polimerasa AmpliTaq® 0,25 U/□L, Tris-HCl (pH 8,9) 500 mmol/L, KCl 100 mmol/L, MgCl₂ 25 mmol/L, Tween®20 0,25% (v/v).

Después de preparar la mezcla de reacción, se alicuotan 6 μL en cuatro tubos en los que previamente se han puesto por separado los ddNTPs. Se someten al siguiente programa de ciclos:

95 °C	30 s	
94 °C	1 min	30 veces
68 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	

Por último, se añaden 4 μL de DLB para parar la reacción y se guarda a -20 °C hasta la separación electroforética.

Electroforesis.

Los componentes del gel son los mismos del apartado 2.1.5.

Tratamiento y carga de la muestra: se calienta a 95 °C y se cargan 3 µL por carril. Se realizan cargas a distintos tiempos para distinguir mejor todas las zonas de la secuencia.

Condiciones de la electroforesis: las mismas del apartado 2.1.5.

Los cristales se separan, el gel se despega del cristal adhiriéndolo a un papel Whatmann, y posteriormente se seca mediante la aplicación simultánea de vacío y calor en un secador de geles.

Una película AGFA Curix se expone al gel, y se revela después de al menos 18 horas.

Búsqueda de homologías en el GenBank.

Una vez leída la secuencia, se introduce en un banco de datos para comprobar la identidad del fragmento de cDNA seleccionado.

Dirección electrónica: www.ncbi.nlm.nih.gov/blast

2.1.8.- Hibridación en ranura (*slot blot*)

2.1.8.1.- Transferencia del mRNA a membranas

En cada membrana se incluyen 250 ng de mRNA de cada uno de los clones seleccionados. Se preparan tantas membranas como bandas seleccionadas se quiera probar como sondas, de manera que se puedan realizar todas las hibridaciones a la vez, en recipientes separados. Para minimizar las diferencias entre las diversas membranas, se prepara una mezcla común en la que se añade el mRNA que se necesite para todas ellas, junto con varios componentes que sirven de tampón o como coadyuvantes para evitar el plegamiento del RNA. La composición de la mezcla inicial es:

mRNA (en Tris-EDTA)	25 %
Formamida	50 %
Formaldehido (37%)	20 %
SSC 20X (NaCl 3 mol/L , citrato trisódico 0,3 mol/L)	5 %

Las distintas mezclas se calientan a 65 °C durante 15 minutos, y después se añaden 6,5 volúmenes de SSC 15X .

Una vez recortadas las membranas (Qiabrane, Qiagen) del tamaño deseado, se sitúan en un soporte (Minifold II-Slot Blotter, Schleicher & Schuell) acoplado a un sistema de vacío. En unos pocillos en forma de ranura, directamente sobre la membrana, se depositan 150 µL de la mezcla. La aspiración por el vacío permite la adsorción del mRNA. Por último, las membranas se dejan secar, y el mRNA se fija mediante iluminación con luz UV.

2.1.8.2.- Obtención de sondas y marcaje radiactivo

Las distintas bandas de cDNA clonadas en el plásmido pCR 2.1 y purificadas tras su digestión, como se explica en el apartado 2.1.6, son el material que, previo marcaje radiactivo, se utiliza como sonda en la hibridación.

El marcaje radiactivo se realiza utilizando el equipo Prime-IT® II (Stratagene). Se basa en la utilización de cebadores (nonámeros) aleatorios que se aparean con el DNA molde que se desea marcar a lo largo de su secuencia, y mediante la acción del fragmento de Klenow de la DNA-polimerasa I, se sintetizan cadenas de DNA, que incorporan el trifosfodesoxirribonucleótido marcado radiactivamente que se haya incluido junto con los no marcados.

Una mezcla de reacción típica es:

Componente	Volumen (μL)
DNA molde	X
cebador (nonámero)	10
H ₂ O	(24 - x)
volumen final	34

Se calienta la mezcla a 95 °C durante 5 minutos, y a continuación se añade:

Componente	Volumen (μL)
Tampón 5X	10
[$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP(3000 Ci/mmol)	5
Enzima de Klenow (5 U/ μL)	1

La mezcla final (50 μL) se incuba 37-40 °C durante 10 minutos.

Transcurrida la incubación, y para eliminar los nucleótidos marcados radiactivamente que no se han incorporado a las cadenas de DNA sintetizadas en la reacción, se hace pasar la mezcla final por filtros en columna Quick Spin™ (Boehringer Mannheim), que solo dejan pasar los fragmentos más grandes de DNA (marcados o sin marcar), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Del filtrado final, se toman 2 μL para medir la radiactividad que tienen, de manera que se puedan añadir en la posterior hibridación fragmentos con un número conocido de cuentas por minuto (CPM).

2.1.8.3.- Condiciones de la hibridación y lavados.

Las membranas se humedecen con SSC 2X, se introducen en tubos de polipropileno y se adhieren a sus paredes, dejando el mRNA hacia la luz del tubo.

Se incuban en un horno de hibridación durante dos horas a 42 °C en una solución de prehibridación, que contiene:

- 50% de formamida
- SSC 5X
- solución de Denhardt 5X (polivinilpirrolidona 1 g/L, albúmina sérica bovina 1 g/L, ficol 400 1 g/L).

A esta solución se añade DNA de esperma de salmón con una concentración final de 0,1 g/L, previamente hervido para desnaturalizarlo.

A continuación se vacían los tubos y se añade la solución de hibridación, que contiene:

- 50% de formamida
- SSC 5X
- Solución de Denhardt 1X
- Sulfato de dextrano 10% (p/v)

En esta solución se incorpora de nuevo DNA de esperma de salmón (0,1 g/L) desnaturalizado, y por último se añade la sonda marcada radiactivamente, en cantidad suficiente para que haya unas 10^6 CPM por mL de solución de hibridación.

Se continúa la incubación a 42 °C durante, al menos, 18 horas.

Al día siguiente, se sacan las membranas de los tubos y se hacen los siguientes lavados:

30 minutos a temperatura ambiente, con una solución de SSC 2X y SDS 0,1% (p/v)

60 minutos a 55 °C, con una solución de SSC 2X y SDS 0,1% (p/v)

30 minutos a 55 °C, con una solución de SSC 0,1X y SDS 0,1% (p/v)

Por último, la membrana se envuelve en plástico y se expone a una película Hyperfilm™ (Amersham) dentro de un casete con pantallas intensificadoras de la señal a -80 °C.

2.1.9.- Hibridación Northern

2.1.9.1.- Separación electroforética del mRNA

Se someten 10 µg del mRNA obtenido de cada clon mediante el equipo Mini Ribo-Sep a electroforesis en un gel de agarosa (1,1%) con formaldehído 2,5 mol/L y MOPS 1X.

Antes de cargar el mRNA en los pocillos, se hace la siguiente mezcla:

mRNA	20 %
Formamida	50 %
Formaldehído (37%)	20 %
MOPS 10X	10 %

Se calienta a 65 °C durante 10 minutos y se pasa inmediatamente a hielo. Se añade "RNA Blue Juice" 6X (1/6 del volumen final) y por último se introducen las muestras en los pocillos.

La electroforesis se lleva a cabo a un voltaje constante de 25 V unas 18 horas.

2.1.9.2.- Transferencia del mRNA a una membrana

Una vez acabada la electroforesis, el gel se tiñe en una solución de bromuro de etidio (1mg/L) preparada con agua-DEPC, y se destiñe en agua-DEPC durante dos horas, en agitación. Se toma una fotografía del gel (graduada con una regla, para tener una escala con que poder medir la posición de la señal en la membrana tras la hibridación).

A continuación, se baña el gel en SSC 20X durante 60 minutos (renovando la solución un par de veces), antes de proceder a la transferencia estándar por capilaridad a membranas QIABRANE de Qiagen, utilizando como tampón de transferencia una solución de SSC 10X.

Tras al menos 16 horas de transferencia, se fija el RNA a la membrana por iluminación con luz UV durante 1,5 minutos.

2.1.9.3.- Obtención de sondas y marcaje radiactivo

Igual que en 2.1.8.2

2.1.9.4.- Condiciones de la hibridación y lavados

Igual que en 2.1.8.3.

2.1.10.- Preparación de una genoteca de cDNA (Stratagene).

Se sigue el procedimiento que aconseja la casa comercial en el manual de instrucciones de ZAP Express™ cDNA Synthesis Kit.

Se parte de 5 µg de mRNA de las células S15 obtenido mediante Mini Ribo-Sep.

Esquemáticamente, el procedimiento para la preparación de la genoteca es el siguiente:

- Síntesis de la primera cadena de cDNA:

Componente	Volumen (μL)
mRNA (5 μg)	6
Tampón 10X	5
dATP, dGTP, dTTP (10 mmol/L) + metil-dCTP (5 mmol/L)	3
Cebador (1,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	2
Inhibidor de RNAsa (40 U/ μL)	1
M-MuLV-RT (50 U/ μL)	1,5
H ₂ O-DEPC	31,5

Incubación: 1 hora a 37 °C

- Síntesis de la segunda cadena de cDNA:

Componente	Volumen (μL)
Producto de síntesis de la 1ª cadena	45
Tampón 10X	20
dATP, dGTP, dTTP (10 mmol/L) + dCTP (26 mmol/L)	6
[$\alpha^{32}\text{P}$]dATP (800 Ci/mmol)	2
RNAsa H (1,5 U/ μL)	2
DNA polimerasa I (9 U/ μL)	11,1
H ₂ O destilada estéril	113,9

Incubación: 2,5 horas a 16 °C

- Formación de extremos romos:

Componente	Volumen (μL)
Producto de síntesis de la 2ª cadena	200
dNTPs (2,5 mmol/L de cada)	23
DNA-polimerasa <i>Pfu</i> (2,5 U/ μL)	2

Incubación: 30 minutos a 72 °C.

El producto se extrae con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), y luego se precipita el DNA con acetato sódico (3 mol/L) y etanol absoluto toda una noche a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después de centrifugar y eliminar el sobrenadante, el pellet se resuspende en 9 μL de una solución con adaptadores *Eco* RI.

- Ligación de los adaptadores *Eco* RI:

Componente	Volumen (μL)
cDNA bicatenario + adaptadores <i>Eco</i> RI	8
Tampón de la ligasa 10X	1
γATP (10 mmol/L)	1
T4 DNA-ligasa (4 U/ μL)	1

Incubación: 18 horas a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Inactivación de la enzima: 30 minutos a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Fosforilación de los extremos del adaptador *Eco* RI ligado:

Componente	Volumen (μL)
Producto de la ligación	11
Tampón de la ligasa 10X	1
γATP (10 mmol/L)	2
T4 polinucleótido quinasa (10 U/ μL)	1
H_2O estéril	6

Incubación: 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

Inactivación de la enzima: 30 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

- Digestión con *Xho* I:

Componente	Volumen (μL)
Producto de la fosforilación	21
Tampón de <i>Xho</i> I 10X	28
<i>Xho</i> I (40 U/ μL)	3

Incubación: 1,5 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se añaden 5 μL de tampón STE 10X (volumen final: 57 μL)

- Separación por tamaños del cDNA:

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se prepara una columna de Sephacryl S-500 (en una jeringa de 1 mL) y se hace pasar por ella mediante centrifugación (2 minutos a 400g) el producto de la digestión.

Se recoge en un tubo de microcentrifuga el primer filtrado (fracción 1).

Se añade STE 1X (60 μ L) y se vuelve a centrifugar. El filtrado que se recoge es la fracción 2. Este proceso se repite otras dos veces, de manera que se recogen 4 fracciones.

Para comprobar el tamaño de los cDNAs recuperados, se separan en un gel de poliacrilamida al 5%, que se tiñe con bromuro de etidio y luego se seca y se expone a una película.

Extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), seguida de precipitación con etanol y centrifugación del DNA de las distintas fracciones. Tras eliminar el sobrenadante y secar el *pellet*, se resuspende en 3 μ L de H₂O estéril.

- Cuantificación del cDNA obtenido:

Se dispensan 0,5 μ L de preparaciones de DNA de esperma de salmón de diferentes concentraciones sobre una placa de agarosa (0,8%)/TAE con bromuro de etidio, y se hace lo mismo con las 4 fracciones de cDNA obtenidas. Se ilumina con luz UV y se compara la intensidad de las manchas de las fracciones con la del patrón de concentraciones.

- Ligación del cDNA con el vector ZAP Express:

Se utiliza una cantidad aproximada de 100 ng de cDNA para ligar a 1 μ g de vector.

Componente	Volumen (μ L)
cDNA (100 ng)	2,5
Tampón de la ligasa 10X	0,5
γ ATP (10 mmol/L)	0,5
Vector ZAP Express (1 μ g/ μ L)	1,0
DNA-ligasa T4 (4 U/ μ L)	0,5

Incubación: 20 horas a 12 °C.

- Empaquetamiento del producto de la ligación en los bacteriófagos:

Mezclar los siguientes componentes:

Extracto de empaquetamiento Gigapack III® Gold \approx 20 μ L

Producto de ligación 1 μ L

Mezclar suavemente e incubar 2 horas a 22°C.

Añadir: Tampón SM* 500 μ L

Cloroformo 20 μ L

*Tampón SM: NaCl 0,1 mol/L, MgSO₄ 8 mmol/L, Tris-HCl (pH7,5) 50 mmol/L, gelatina 0,01% p/v.

- Preparación de las bacterias para el crecimiento de los virus:

Se siembran bacterias XL1-Blue MRF' en placas de LB-tetraciclina y se incuban toda la noche a 37°C. Se escoge una colonia y se pone a crecer en LB-MgSO₄(10mmol/L)-maltosa (0,2% p/v), en agitación a 37 °C durante las horas necesarias (3-4) para que el cultivo alcance una absorbancia (A₆₀₀) de alrededor de 0,5.

Se centrifugan las bacterias a 500g durante 10 minutos. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el *pellet* en MgSO₄ para que la absorbancia sea A₆₀₀ = 0,5.

- Recuento del número de bacteriófagos efectivos:

Se mezclan los siguientes componentes en un tubo de 5 mL:

Producto de la reacción de empaquetamiento	1 μL
Bacterias XL1-Blue (A ₆₀₀ = 0,5)	200 μL

Incubación de 15 minutos a 37 °C en agitación.

Añadir:

Agar NZY (a 48 °C)	4 mL
IPTG 0,5 mol/L	15 μL
X-Gal (250 mg/mL)	50 μL

Se vierte la mezcla rápidamente en placas de petri de 10 cm de diámetro y se deja solidificar.

Se invierte la placa y se incuba a 37 °C hasta que se vean las calvas de los virus en el césped bacteriano.

Se cuenta el número de calvas "blancas" (no azules) y se multiplica por el número de μL totales.

- Amplificación de la genoteca:

Se mezclan los siguientes componentes en un tubo de 15 mL:

Producto de la reacción de empaquetamiento	Suficiente para ≈ 50 000 virus
Bacterias XL1-Blue (A ₆₀₀ = 0,5)	600 μL

Se incuba 15 minutos a 37 °C en agitación.

Se añade agar NZY (a 48 °C) 9 mL

Se vierte en placas de petri de 15 cm de diámetro y se deja solidificar.

Se invierten las placas y se incuban a 37 °C durante la noche.

Se añaden 10 mL de tampón SM y se deja a 4 °C en agitación horizontal toda la noche.

Se recoge el SM de todas las placas y se añade cloroformo hasta un 5% final.

Se mezcla y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente.

Se centrifuga a 500g 5 minutos.

Se recoge el sobrenadante, se añade cloroformo hasta un 0,03% final y DMSO hasta un 7% final, y se alicuota para conservar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.1.11.- Cribado de la genoteca de cDNA.

2.1.11.1.- Preparación de placas con virus

En primer lugar, hay que recontar los virus para ajustar el número de calvas por placa, de manera que se consigan unas 50 000 por placa de 15 cm (1^{er} cribado). Este recuento se hace en placas de 10 cm:

Suspensión de la genoteca (y diluciones)	1 μL
Bacterias XL1-Blue ($A_{600} = 0,5$)	200 μL

Incubación de 15 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación.

Añadir:

Agar NZY (a $48\text{ }^{\circ}\text{C}$)	4 mL
--	------

Se vierten las mezclas rápidamente en placas de petri de 10 cm de diámetro y se dejan solidificar.

Se invierten las placas y se incuban a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se vean las calvas de los virus en el césped bacteriano. Se cuentan y se decide la dilución necesaria para el cribado.

Para sembrar las placas de 15 cm se procede así:

Suspensión de la genoteca (y diluciones)	1 μL
Bacterias XL1-Blue ($A_{600} = 0,5$)	600 μL

Incubación de 15 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en agitación.

Añadir:

Agar NZY (a $48\text{ }^{\circ}\text{C}$)	9 mL
--	------

Se vierte la mezcla rápidamente en placas de petri de 15 cm de diámetro y se deja solidificar.

Se invierte la placa y se incuba a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se vean las calvas de los virus en el césped bacteriano.

Se dejan en nevera hasta que se haga la transferencia a las membranas.

En el primer cribado, se pretende rastrear todos los virus diferentes que existen en la genoteca; por eso se siembran 50000 por placa: para poder abarcar muchos en el menor número posible de placas. Esto implica que las calvas son indistinguibles unas de otras.

En cribados posteriores, para identificar calvas aislables, se ajustan las diluciones para que no crezca por cada placa (preferiblemente ya de 10 cm) una cantidad de virus excesiva, de manera que se puedan recortar de la placa las calvas sin peligro de contaminarse con las calvas próximas.

2.1.11.2.- Transferencia de los virus a membranas

Una vez crecidos los virus y puestas a enfriar las placas en la nevera, se preparan membranas circulares (Hybond-N, Amersham Pharmacia) de tamaño adecuado a la placa que se use, rotulándolas convenientemente.

Cuidando de que no se formen burbujas, se depositan las membranas sobre la superficie de la placa y se dejan de ese modo durante 2 minutos. Mientras se están transfiriendo los virus, se realizan marcas por punción con una aguja impregnada en tinta china, de manera que se atravesase tanto la membrana como el agar, y se dejen así señales perfectamente diferenciables entre placas, y superponibles una vez separada la membrana. Estas marcas permitirán localizar las calvas cuyos virus hayan hibridado con la sonda que se utiliza.

Después de despegar la membrana del agar, se sumerge en una solución desnaturante de DNA (NaCl 1,5 mol/L y NaOH 0,5 mol/L) durante 2 minutos.

A continuación, se sumerge en una solución neutralizante (NaCl 1,5 mol/L y Tris-HCl (pH 8,0) 0,5 mol/L) durante 5 minutos.

Por último, se lava, durante como máximo 30 segundos, en una solución tampón de Tris-HCl (pH 7,5) 0,2 mol/L y SSC 2X.

Se dejan secar sobre papel de filtro y se fija el cDNA a la membrana por radiación UV (1,5 minutos).

Las placas deben guardarse a 4 °C para evitar el crecimiento bacteriano hasta que se haya hecho la hibridación y se hayan podido identificar y aislar las calvas candidatas.

2.1.11.3.- Obtención de sondas y marcaje radiactivo

Se procede como en el apartado 2.1.8.2

2.1.11.4.- Condiciones de la hibridación y lavados

Se procede como en el apartado 2.1.8.3

2.1.11.5.- Reconocimiento y aislamiento de virus seleccionados

Las marcas que se hicieron con tinta china en las membranas (y el agar de las placas), permiten señalar también las películas obtenidas tras la hibridación. Hecho esto, se pueden superponer las películas y las placas de agar, de manera que, por transiluminación, se identifican las calvas que han hibridado con la sonda que usamos.

Para aislar estas calvas, se recortan con puntas de pipeta estériles y se introducen en un tubo eppendorf con un tampón SM y cloroformo (5% final), y se agita bien para facilitar la salida de los virus del agar hacia el tampón. Luego se conservan a 4 °C hasta que se vayan a transferir a bacterias apropiadas para obtener el fásmidio con el inserto del cDNA.

2.1.11.6.- Obtención de bacterias con el fásmido.

Se prepara la mezcla siguiente en un tubo de 15 mL:

Bacterias XL1-Blue ($A_{600} = 0,5$)	200 μ L
Solución de bacteriófagos (con más de 10^5)	250 μ L
Bacteriófago ayudante ExAssist	1 μ L

Incubación de 15 minutos a 37 °C en agitación.

Añadir:

NZY (líquido)	4 mL
---------------	------

Incubación de 3,5 horas a 37 °C con agitación.

Se calienta el tubo a 65-70 °C durante 20 minutos, y luego se centrifuga 15 minutos a 1000g.

Se recoge en otro tubo el sobrenadante, que contiene el fásmido.

Se prepara la siguiente mezcla:

Bacterias XLOLR ($A_{600} = 1$)	200 μ L
Sobrenadante con el fásmido	100 μ L

Incubación de 15 minutos a 37 °C.

Se añade:

NZY (líquido)	300 μ L
---------------	-------------

Incubación de 1 hora a 37 °C.

Se siembran una o más placas de agar-LB-kanamicina (50 μ g/mL) con diversos volúmenes de la mezcla y se incuban durante la noche a 37 °C.

Al día siguiente, se aíslan diversas colonias y se hacen crecer separadamente en LB-kanamicina (50 μ g/mL) líquido para comprobar si contienen los fásmidos buscados (esta comprobación se realiza mediante PCRs con los cebadores M13 forward y reverse).

2.1.11.7.- Obtención de los fásmidos.

Se emplea el equipo GFX™ MicroPlasmid Prep Kit de Pharmacia, siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras centrifugar los cultivos bacterianos, el pellet se resuspende en una solución isotónica, con RNAsa (Tris-HCl (pH 7,5) 100 mmol/L, EDTA 10 mmol/L, RNAsa I 400 μ g/mL) y las bacterias se rompen mediante una solución de lisis (NaOH 1 mol/L, SDS 1%), que además desnaturaliza el DNA y las proteínas; por último, se añade una solución de neutralización (con acetato potásico y una sal caotrópica) antes de centrifugar. El sobrenadante se introduce en las columnas de matriz de fibra de vidrio que contiene el equipo, y se centrifuga para hacer pasar el líquido, mientras el DNA del plásmido queda retenido en la matriz. Luego se hace pasar del mismo modo una solución de lavado (con Tris-HCl pH 7,5 y EDTA). Al final, se aplican a la columna 100 μ L de TE para eluir el plásmido por centrifugación (14000g durante 1 min).

2.2.- RESULTADOS

2.2.1.- Prospección de la expresión génica diferencial en variantes metastásicas por RAP-PCR

El método RAP-PCR tiene como principal utilidad la comparación simultánea de la expresión de numerosos genes en diferentes tipos de células, que se distinguen entre sí por una o más características que interesa estudiar. En el presente trabajo, se ha empleado este método para comparar diversas variantes celulares que tienen características metastásicas diferentes, aunque comparten antecedentes genéticos.

Por un lado, se pretende analizar la expresión génica diferencial que podría explicar la diversa capacidad de las células para originar metástasis. Este estudio se ha llevado a cabo con un modelo celular de cáncer de mama murino, denominado MXT, constituido por diversos clones celulares. Las células de este modelo, inyectadas en ratones, producen metástasis que se localizan siempre en los pulmones, aunque el número de focos metastásicos que originan varía según las características de cada clon. Esto supone que el modelo permite comparar la capacidad de producción de focos metastásicos.

Por otra parte, se han analizado las diferencias en la expresión génica que podrían explicar la especificidad con que unas células originan metástasis en unos determinados órganos y no en otros. Para este estudio se ha empleado el modelo celular de cáncer de mama humano denominado MDA-MB 435, constituido también por diferentes clones celulares, cuya capacidad metastásica es muy similar, pero que se diferencian por su organoespecificidad en la producción de metástasis cuando se inyectan en ratones inmunocompetentes.

El estudio de ambos modelos permite, por tanto, contemplar dos aspectos distintos y complementarios de las características metastásicas de las células tumorales del cáncer de mama.

En el estudio mediante RAP-PCR se emplea el RNA de células cultivadas *in vitro*, que se obtiene en diversos experimentos de cultivo independientes para atenuar los cambios de la expresión génica atribuidos a las variables inherentes a un cultivo celular (densidad celular, agotamiento de los nutrientes, etcétera)

Aunque la determinación de la capacidad metastásica de cada clon celular analizado se ha hecho paralelamente mediante un estudio *in vivo*, es razonable aceptar que algunas características de la expresión génica que las células muestran *in vitro* se puedan relacionar con el distinto comportamiento metastásico *in vivo*.

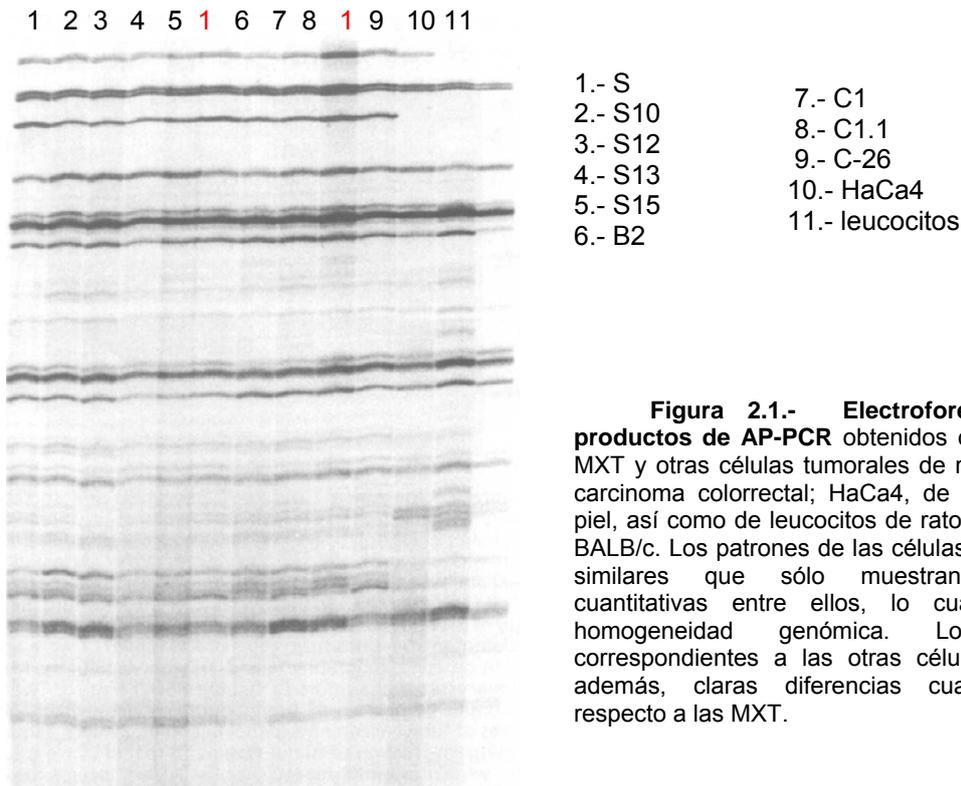


Figura 2.1.- Electroforesis de los productos de AP-PCR obtenidos con clones de MXT y otras células tumorales de ratón: C26, de carcinoma colorrectal; HaCa4, de carcinoma de piel, así como de leucocitos de ratonas desnudas BALB/c. Los patrones de las células MXT son tan similares que sólo muestran diferencias cuantitativas entre ellos, lo cual indica su homogeneidad genómica. Los patrones correspondientes a las otras células muestran, además, claras diferencias cualitativas con respecto a las MXT.

2.2.1.1.- Variantes de distinta capacidad metastásica (modelo MXT)

Los distintos clones celulares obtenidos a partir de la línea parental (S) del modelo MXT tienen capacidad de formar tumores en animales inmunocompetentes, pero sus respectivas capacidades metastásicas son diferentes.

Dado que todos los clones derivan de una única línea parental, era de esperar que hubiese entre ellos pocas diferencias genómicas. Esto se ha comprobado mediante una prueba denominada AP-PCR, similar al RAP-PCR, con la principal diferencia de utilizar DNA genómico en vez de RNA como material de partida. En la **figura 2.1** se observa la práctica igualdad de los patrones obtenidos para todas las variantes celulares MXT analizadas, lo que indica la existencia de la esperada homogeneidad genómica entre ellas.

En consecuencia, se puede asumir que las diferencias que haya en la capacidad metastásica de las variantes celulares analizadas se deben a cambios en la expresión génica, que podrían favorecer alguna de las etapas del proceso metastásico, y así facilitar a las células tumorales la capacidad de desarrollarse en otros órganos distintos del primero en que crecieron.

El estudio *in vitro* de las diferencias de expresión entre los distintos clones es un paso inicial para detectar genes que podrían estar implicados en el origen de las diferencias de capacidad metastásica *in vivo* de estos clones.

El método de RAP-PCR permite visualizar una serie de bandas de distinto tamaño, correspondientes a fragmentos de cDNAs de genes anónimos, cuyos mRNAs específicos se encuentran presentes en las muestras de mRNA de los clones celulares que se comparan.

Las bandas obtenidas se distribuyen según un patrón característico para cada clon celular. La comparación de patrones de bandas entre los clones genómicamente homogéneos nos permite localizar diferencias cualitativas (aparición o desaparición de bandas en unos clones con respecto a otros, que sirven como referencia) o cuantitativas (aumento o disminución de la intensidad de determinadas bandas).

Las comparaciones entre clones sólo son posibles cuando se obtienen patrones de bandas no solo característicos, sino también reproducibles para cada clon. Para conseguirlo, en el caso de los clones de MXT, se probaron variadas condiciones de reacción, y en especial diferentes cebadores, y se escogieron aquellos que permitían originar patrones de al menos 50 bandas.

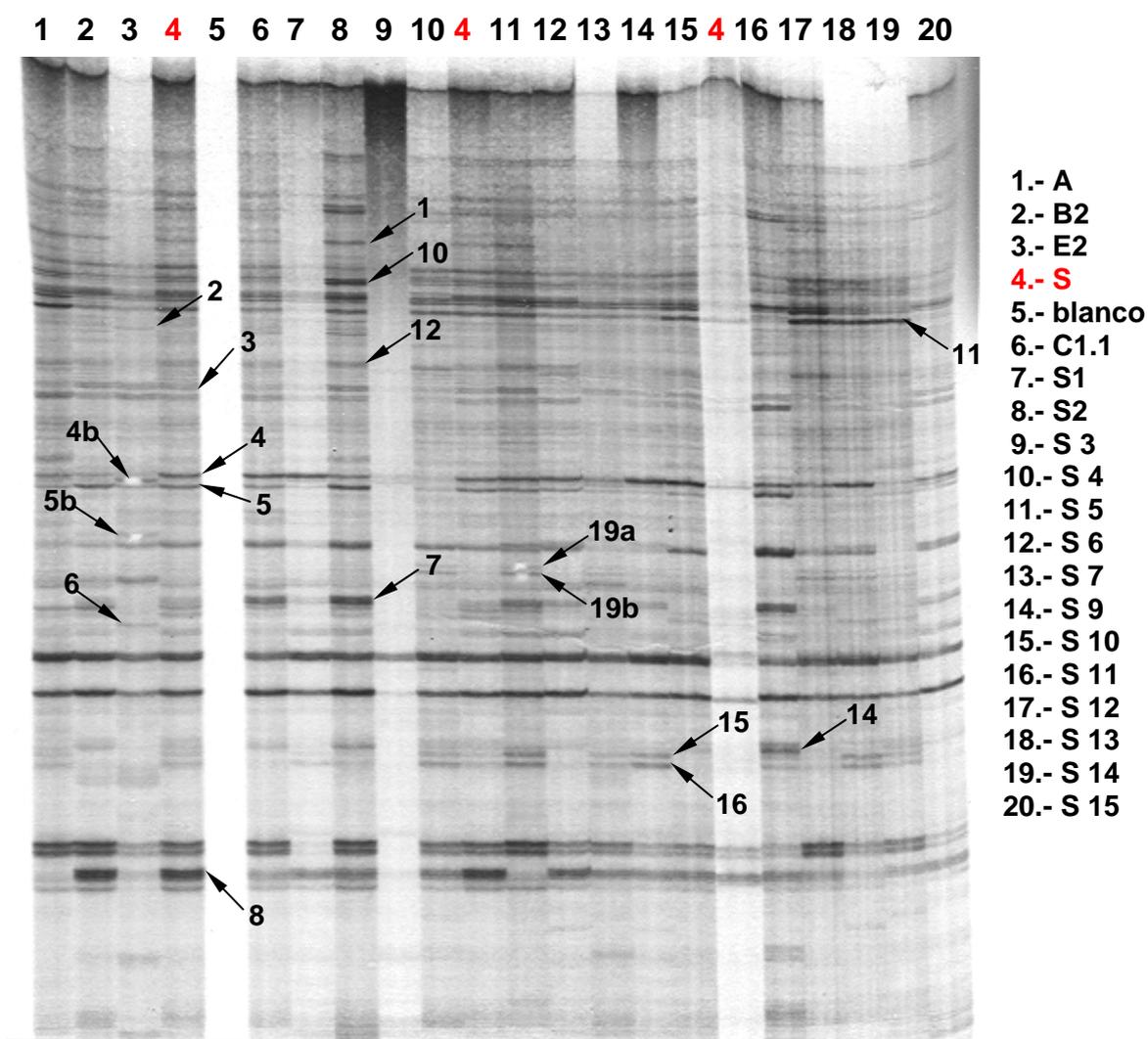


Figura 2.2.- Electroforesis de los productos de RAP-PCR obtenidos con los clones de MXT. Se observan patrones de bandas homogéneos en todos los casos, con diferencias principalmente cuantitativas en la intensidad de las bandas. Se han señalado con flechas y números las bandas que se han recortado del gel para su posible estudio posterior. Asimismo, se pueden observar los huecos dejados en varios casos (bandas 4b, 5b, 19a y 19b), que permiten valorar la exactitud de los recortes.

Al comparar los patrones de los distintos clones, se observa un aspecto homogéneo (**figura 2.2**). Sin embargo, se comprueba que existen diferencias, sobre todo cuantitativas, en la intensidad de determinadas bandas (algunas de las cuales se señalan con flechas en la figura). Antes de proceder a recortarlas del gel para proseguir su estudio, se deben tener en cuenta varios aspectos: principalmente, el número de casos en que aparece modificada su intensidad, y las características metastásicas del clon en el que aparece modificada. Tras un análisis detallado de las diferencias, se seleccionan aquellas bandas que se consideran más representativas.

En la **Tabla 2.1** se resume el resultado de la comparación de las bandas seleccionadas, que se han numerado arbitrariamente. La aparición de bandas con respecto al clon que se ha tomado como referencia (S) se señala con signos +, y la desaparición con signos -. Si la apariencia es como en S, se señala con un signo =. La mayor o menor intensidad se indica mediante flechas hacia arriba o hacia abajo, respectivamente.

En experimentos paralelos al de RAP-PCR, se determinó la capacidad metastásica *in vivo* de algunos de los clones. Con esos resultados, se decidió escoger varios clones de elevada capacidad metastásica, como el C1.1 (gran productor de metástasis, tanto espontáneas como experimentales), el B2 (gran productor de metástasis experimentales, pero no espontáneas) y el E2 (gran productor de metástasis espontáneas, y no tanto experimentales); otros de capacidad metastásica moderada, como el S (el original), el S15 y el S12; y otros de baja capacidad metastásica como el S10 y el S13.

La disposición de los datos en una tabla permite determinar qué bandas presentan cambios más frecuente o más significativamente en los clones seleccionados. Así, de las bandas presentadas en la tabla, se prefirieron aquellas que mostraban en conjunto más diferencias, sobre todo comparando los clones más y menos metastásicos.

bandas recortadas	CLONES DE MXT																			Incidencia de cambios de intensidad
	S	A	B2	E2	C1.1	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	
1	∃	=	=	-	↓	-	↑	-	-	↑	-	-	-	-	=	=	↓	↓	-	14
2	∅	=	=	+	=	=	+	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	2
3	∃	↑	=	=	=	↓	=	-	↓	↑	=	-	↓	↓	↑↑	↓↓	↓	↓	=	12
4	∃	↓	↓	↓↓	=	=	↓	↓↓	↓↓	=	=	↓	=	=	=	=	=	↓↓	↓	9
4b	∅	=	=	+	=	=	=	=	=	=	=	+	=	=	=	=	=	=	+	3
5	∃	↓	=	↓	↓	↓↓	=	-	↓↓	=	=	↓	↓↓	↓	↑	↓	↓↓	↓	↓	14
5b	∅	=	+	+	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	2
6	∅	=	=	+	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	1
7	∃	-	↓	-	↓	↓	↑	-	-	↑	=	-	=	-	↑	↓↓	-	-	=	15
8	∃	↓↓	=	↓↓	↓	↓	↓	-	↓	↓↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓↓	↓	↓	17
10	∃	=	↓	↓↓	=	-	↑	-	=	=	=	↓	↓	↓	↓	=	=	=	↓	10
11	∃	=	↓	↓	=	↓↓	=	-	=	=	↓	↓	↓	=	↓↓	=	=	=	↓↓	9
12	∃	=	=	↓↓	=	-	=	-	=	=	=	↓↓	↓↓	↓	↓↓	=	↓↓	↓↓	↓↓	10
14	∃	↓↓	=	-	=	-	↑	-	=	=	↓	↓	↓	=	↑	-	-	↓	↓	13
15	∃	=	-	-	-	-	-	-	=	↑	-	=	↑	↓↓	↓↓	-	↑	=	-	14
16	∃	=	-	-	↓↓	=	=	-	↑	↑	↓↓	=	↑	-	=	↓	=	=	-	11
19a	∅	=	=	=	=	=	=	=	+	+	=	+	=	=	=	+	+	+	=	6
19b	∅	=	=	=	=	=	=	=	+	+	=	+	=	=	=	+	+	+	=	6

Tabla 2.1.- Resumen de las diferencias en la intensidad de un conjunto de bandas seleccionadas del gel con los productos del RAP-PCR de mRNAs de los distintos clones de MXT. Las diferencias están referidas siempre a las células originales (S). El símbolo ∅ indica que la banda no aparece en S, y el símbolo ∃, que sí aparece; + significa aparición de una banda; y -, desaparición de una banda. Los signos = indican coincidencia aproximada con S, y las flechas hacia arriba o hacia abajo, simples o dobles, dan idea del aumento o disminución, respectivamente. Todas las diferencias se encontraron en el mismo gel de RAP-PCR.

2.2.1.2: Variantes de distinta organoespecificidad de las metástasis (RAP MDA-MB 435)

Los clones de la línea celular humana MDA-MB 435 que se emplean en el presente trabajo, han sido obtenidos de las metástasis de tumores de mama, originadas a partir de las células parentales (P), en diversos órganos de ratones: cerebro (BRAIN) y pulmón (LUNG), sobre todo; pero también en ganglios (GNG1), hígado (LIVER 2 y 3) y hueso (BONE 1 y 2).

La línea parental, P, es heterogénea: contiene subpoblaciones celulares de características distintas, tal como ocurre en los tumores. Esto podría explicar el hecho de que a partir de una sola población originaria se establezcan metástasis en órganos muy distintos, que aportan entornos muy dispares a las células.

Como en el caso del modelo MXT, cabe plantearse si estas diferencias tienen un origen genómico (es decir, si pueden explicarse por fenómenos como variaciones cromosómicas) o se deben a la expresión diferencial de los genes.

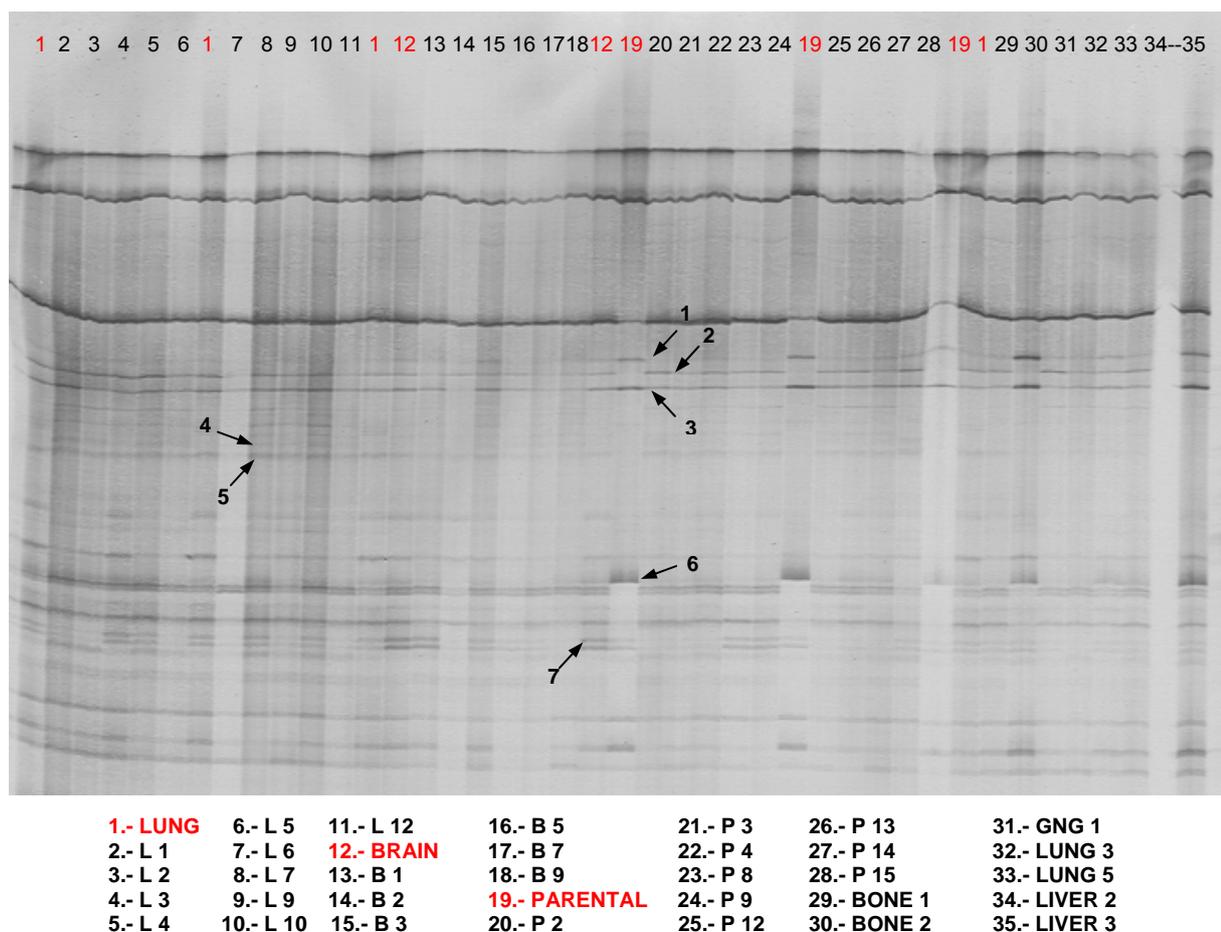


Figura 2.3.- Electroforesis de los productos de RAP-PCR obtenidos con los clones de MDA-MB 435. Se observan patrones de bandas homogéneos en todos los casos, con diferencias principalmente cuantitativas en la intensidad de las bandas. Se han señalado con flechas y números las bandas que se han recortado del gel para su posible estudio posterior.

Antes de pasar a demostrar si ocurre esto último, es necesario comprobar que todos los clones que se analizan son homogéneos, desde el punto de vista genómico. Esta homogeneidad genómica de los distintos clones derivados de la línea parental (P) ya había sido comprobada y documentada antes de comenzar el presente estudio (130).

Al someter a las distintas variantes celulares a un análisis por RAP-PCR, la imagen resultante (**figura 2.3**) ofrece un patrón menos definido y abundante en bandas que en el caso de MXT, aunque igualmente característico y reproducible. En la visión general, no se observa una expresión muy diferenciada por órganos de residencia, al menos por lo que respecta a las bandas más intensas (es decir, las correspondientes a los genes más expresados), que son las que se señalan con flechas en la figura y que posteriormente se han recortado del gel. El patrón de las células parentales es el que presenta mayores diferencias con respecto a los demás: incluso los de aquellas células que derivan del clon Parental por dilución límite se parecen más entre sí que al P. Los únicos clones de patrón

casi idéntico al de P son BONE2 y LIVER3.

En un nuevo análisis por RAP-PCR, realizado utilizando una pareja distinta de cebadores, se obtiene la imagen que se observa en la **figura 2.4**. En este caso, se han estudiado solamente los clones originales Parental, Lung y Brain, y se muestran los resultados por duplicado. Como puede observarse, el patrón es reproducible, pero resulta más homogéneo que en el caso de

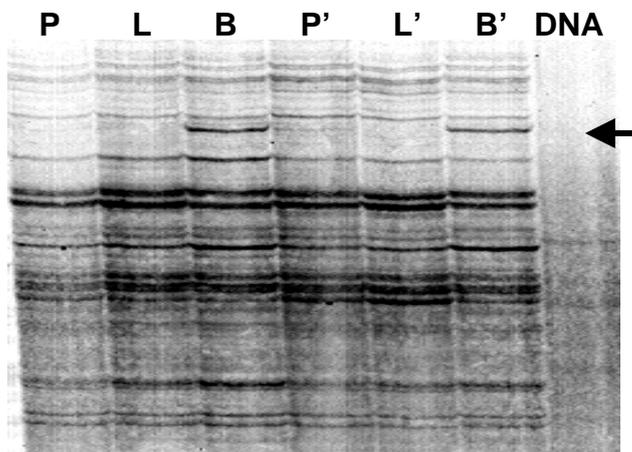


Figura 2.4.- Imagen electroforética del RAP-PCR realizado con nuevos cebadores, utilizando únicamente los clones Parental (P y P'), Lung (L y L') y Brain (B y B'). Se observa diferencia sólo en una banda, señalada con una flecha.

los RAP-PCR anteriores. Una de las diferencias que se han encontrado se señala con una flecha, y se podría considerar a priori como una diferencia cualitativa, puesto que la banda sólo parece estar en el clon Brain.

Por lo que respecta al primer RAP-PCR, las diferencias entre las bandas de los distintos clones son principalmente cuantitativas. Siguiendo la misma notación que en la Tabla 2.1, en la **Tabla 2.2** se presenta un resumen de las bandas que aparecen, desaparecen o cambian de intensidad con respecto al patrón de las células parentales. Teniendo en cuenta el número de diferencias existentes en cada clon (es decir, por columnas), y con la intención de estudiar un conjunto representativo de las células que metastatizan en órganos distintos, se escogen, para proseguir el estudio, los clones

originales aislados de pulmón (LUNG) y cerebro (BRAIN), así como varios clones derivados de ellos por dilución límite (P2, P8, L3 y B2). También se incluye el clon BONE2 (BO2), que es capaz de desarrollar metástasis óseas.

Dado que el número de bandas recortadas no es elevado, se decide continuar el estudio de todas ellas, incluyendo también la banda de expresión diferencial en el segundo RAP-PCR, que no se muestra en la tabla 2.2.

Bandas recortadas	CLONES DE MDA-MB 435																																			
	clones derivados de P										clones derivados de L										clones derivados de B						BONE		GNG		LUNG		LIVER			
	P	2	3	4	8	9	12	13	14	15	L	1	2	3	4	5	6	7	9	10	12	B	1	2	3	5	7	9	1	2	1	3	5	2	3	
1	∃	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	=		
2	∅	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	=	+	+	+	+	+		
3	∃	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	=	=	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	=	↓	=	↓	↓	=	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↑			
4	∃	↓	=	=	↓	↑	=	=	=	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	=	↓	↑	=	↑	↑	=	=	=	=	=	=	=
5	∃	↓	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	=	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	=	=	↑	↑	↑	=	=	=	=	=	=	=
6	∃	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	=	↓	↓	↓	↓	↓	=		
7	∃	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↓	↑	↓	↓	=	=	-	-	=	↓	=	↓	↑	↑	↓	=	↓	↓	-	↓	↓	-	-	-	-	-	-	↓

Tabla 2.2.- Resumen de las diferencias en la intensidad de un conjunto de bandas seleccionadas del gel con los productos del RAP-PCR de mRNAs de los distintos clones de MDA-MB 435. Las diferencias están referidas siempre a las células parentales (P). El símbolo ∅ indica que la banda no aparece en P, y el símbolo ∃, que sí aparece; + significa aparición de una banda; y -, desaparición de una banda. Los signos = indican coincidencia aproximada, y las flechas hacia arriba o hacia abajo, simples o dobles, dan idea del aumento o disminución (fuerte, ↑↓, o leve, ↑↓) respectivamente. Todas estas diferencias se han encontrado en el mismo gel de RAP-PCR.

2.2.2.- Estudio en poblaciones metastásicas de la expresión diferencial de genes localizados por RAP-PCR.

Los clones celulares y las bandas (fragmentos de cDNA) que se van a estudiar, se han elegido según las diferencias que se observaban entre las intensidades de las bandas en las imágenes del RAP-PCR. Sin embargo, dado que se comparan muchos clones al mismo tiempo, el tamaño resultante de estas imágenes es reducido, y los clones escogidos no siempre están en carriles de electroforesis contiguos (además de que la cantidad inicial de mRNA es muy pequeña). Esto puede hacer confusa la apreciación del grado de las diferencias entre las bandas de los distintos clones. Para apreciarlas con mayor detalle, y conseguir cuantificar las relaciones entre los clones con respecto a la expresión de los distintos genes de que proceden los cDNAs seleccionados, se utilizan análisis Northern en las que se usa una cantidad mayor de mRNA (8-10 μ g), y únicamente se incluyen los clones elegidos.

2.2.2.1.- En el modelo MXT.

Las bandas de cDNA seleccionadas se clonan en plásmidos, para luego, una vez aislado el inserto, obtener sondas con que poder valorar, mediante análisis Northern, la expresión del mRNA (del que procede el cDNA) en cada uno de los clones celulares elegidos.

En algunas ocasiones, las bandas de cDNA recortadas no parecen corresponderse después con ningún mRNA transcrito. Puesto que las membranas que se usan en el análisis Northern tienen una vida limitada (esto es, soportan un número limitado de ciclos de hibridación / deshibridación), en vez de someterlas a hibridaciones con todas y cada una de las sondas, se realiza una selección previa de las sondas que verdaderamente reconocen a

un mRNA real. Para ello, se prepara una serie de pequeñas membranas con las mismas cantidades (200 ng) de mRNA de cada clon celular, dispuestas en ranura (figura 2.5).

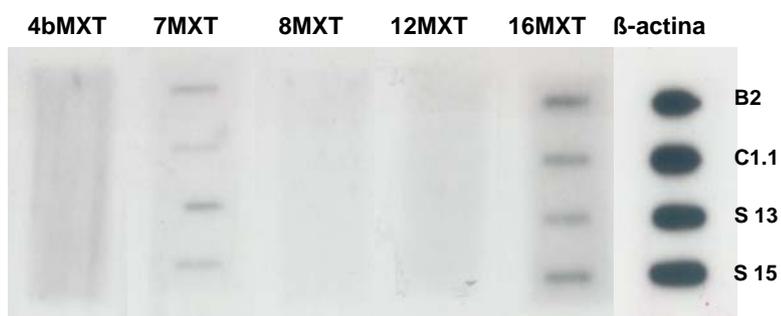


Figura 2.5.- Hibridación en ranura entre el mRNA de algunos clones de MXT y diversas bandas. Se han fijado 200 ng de mRNA de cada clon probado por ranura, en seis membranas diferentes. El objetivo de esta hibridación es confirmar la existencia de RNA correspondiente a las bandas de cDNA, como requisito previo a la hibridación Northern. Se observa que sólo dos de las bandas recortadas del gel corresponden a mRNA. Por tanto, sólo se comparará la expresión entre los clones seleccionados, mediante hibridación Northern, con las bandas 7MXT y 16MXT.

Cada una de estas membranas se hibrida con una sonda distinta y, de este modo, puede saberse si existe un mRNA que se corresponda con el cDNA recortado del gel. En este

momento, no es importante establecer diferencias cuantitativas, sino descartar las sondas que no se pueda demostrar que son de cDNA. Así, los fragmentos 4bMXT, 8MXT y 12MXT no se corresponden con ningún transcrito (al menos, en las condiciones en que se ha probado) y, por tanto, no se sigue su estudio. De las bandas examinadas, únicamente 7MXT y 16MXT muestran reconocer un transcrito. El análisis Northern se realiza, pues, con estos dos cDNAs (figura 2.6).

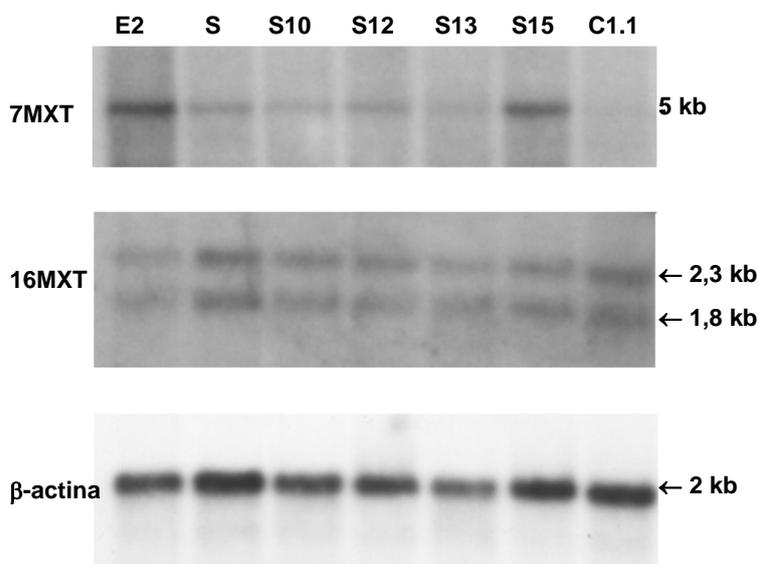


Figura 2.6.- Hibridación Northern de los clones MXT seleccionados. Se han utilizado 10 μ g de RNA poliA de cada clon y, como control de carga, se ha hibridado la membrana con β -actina. La sonda 7MXT reconoce un mRNA de unas 5 kb, cuya expresión aparece casi anulada en el el clon de mayor capacidad metastásica (C1.1). La sonda 16 MXT hibrida con dos mRNAs diferentes, de 2,3 y 1,8 kb.

La sonda 7MXT hibrida con un transcrito de aproximadamente 5 kb. La expresión del correspondiente gen es aparentemente poco abundante en la mayoría de los clones (salvo en E2 y S15), y en las células C1.1 prácticamente no se da. La sonda 16MXT hibrida con dos transcritos de 1,8 kb y 2,3 kb (lo que hace pensar que sea un fragmento común a varias moléculas), y la expresión aparente en todos los clones es similar.

Para cuantificar las diferencias de expresión, se mide la intensidad de las señales (con el programa Phoretix), y el valor obtenido se divide por el correspondiente a la señal de β -actina en cada clon. Como se asume que la β -actina se expresa de manera constitutiva e idéntica en todas las variantes celulares, utilizarla como referencia permite normalizar los valores de las señales, es decir, hacer un ajuste de las posibles diferencias de carga en cada carril de electroforesis, de manera que las señales medidas sean comparables. Por último, estos cocientes se dividen por el correspondiente a las células S para referir a él todas las diferencias.

E2	S	S10	S12	S13	S15	C1.1	Bandas
2,58	1	0,63	0,99	0,61	2,11	0,35	7MXT
0,55	1	0,82	0,71	0,61	0,70	0,78	16MXT-1
0,57	1	0,68	0,58	0,64	0,69	0,51	16MXT-2

Tabla 2.3.- Comparación de la expresión relativa de 7MXT y 16MXT. La medida de la señal de cada banda en cada clon se dividió por la correspondiente a la de β -actina de su mismo carril, y los cocientes se dividieron, a su vez, por el cociente hallado para el clon S, de manera que los valores que aparecen en la tabla representan múltiplos de la señal de S, que se representa, a su vez, como 1. Para 16MXT existen dos transcritos.

En la **Tabla 2.3** se muestran las relaciones existentes entre los distintos clones. En el caso de 16MXT, las diferencias entre cualquier par de clones no superan el valor 0,5 (es decir, que la relación entre las intensidades relativas no llega a ser ni de doble o mitad). En cambio, para 7MXT llega a haberlas muy notables: entre los clones de mayor y menor expresión (E2 y C1.1, respectivamente), la diferencia alcanzó un factor de 7.

2.2.2.2.- En el modelo MDA-MB 435.

De la misma manera que en caso del modelo MXT, mediante el uso de diversas membranas que contenían pequeñas cantidades (unos 200 ng) de mRNA de las células P, P2, P8, L, L3, B, B2 y BO2, se realiza un cribado de las bandas seleccionadas utilizándolas como sondas en una hibridación en ranura (**figura 2.7**). Se observa que únicamente la banda 1MDA no ofrece ningún tipo de señal (al menos, en las condiciones experimentales probadas). Al no poder demostrar que esta banda se corresponda con ningún transcrito, se procede al análisis Northern sólo con el resto.

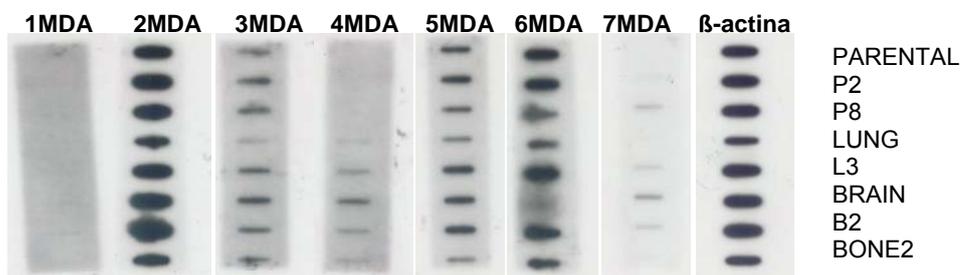


Figura 2.7.- Hibridación en ranura entre el mRNA de clones seleccionados de MDA-MB 435 y las bandas recortadas del gel. El objetivo de esta hibridación es confirmar la existencia de RNA correspondiente a las bandas de cDNA, como requisito previo a la hibridación Northern. Se observa que seis de las siete bandas recortadas del gel corresponden a RNA. Por tanto, se comprobará la expresión mediante hibridación Northern con todas las bandas, excepto 1MDA.

La expresión de los genes correspondientes a las bandas de cDNA se observa en la **figura 2.8**. Los fragmentos 4MDA y 7MDA hibridan, cada uno, con transcritos de distintos tamaños. El 4MDA reconoce al menos tres, de unos 4,9 kb, 3,7 kb y 2,2 kb, y el 7MDA reconoce dos, de unos 5,7 kb y 4,2 kb. Esto supone que existe la posibilidad de que ambos fragmentos se correspondan con familias de genes que compartan secuencias en mayor o menor medida.

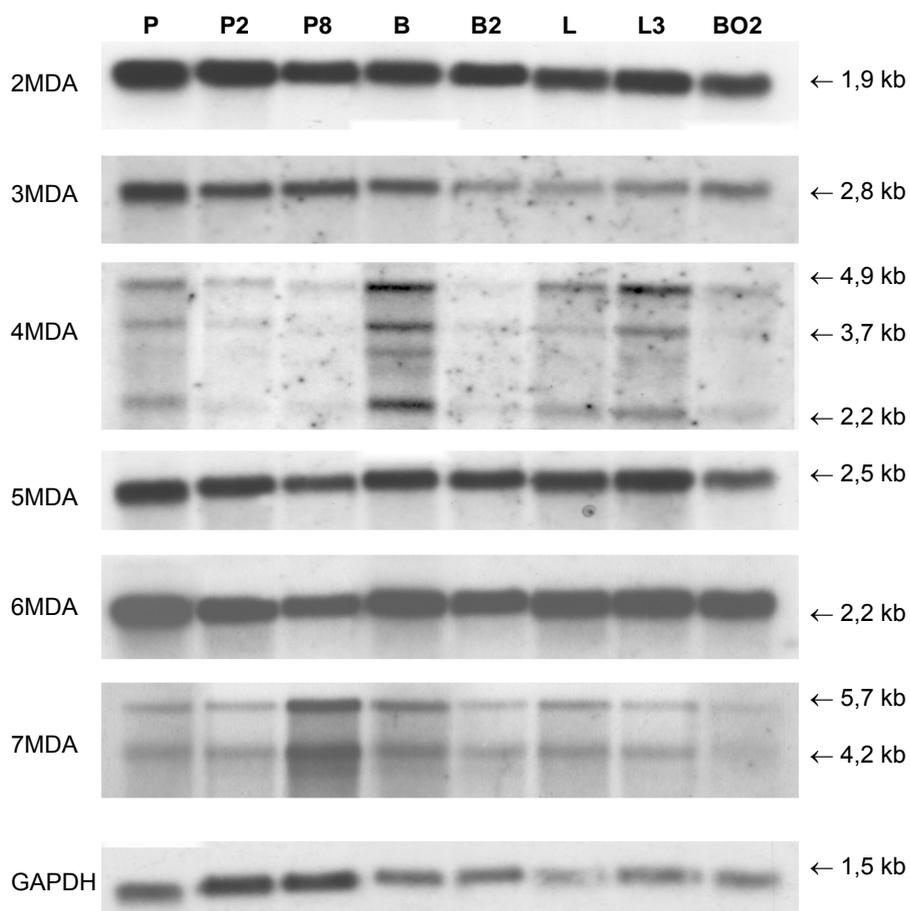


Figura 2.8.- Hibridación Northern de los clones MDA-MB 435 seleccionados. Se han utilizado 8 μ g de RNA poliA de cada clon, y como control de carga, se ha hibridado la membrana con GAPDH. Las mayores diferencias de expresión entre los clones se han dado con las sondas 4MDA y 7MDA

En la **Tabla 2.4** se detallan las relaciones entre la expresión de los genes reconocidos por los fragmentos de cDNAs probados, en los clones celulares seleccionados, con respecto a las células parentales. Para llegar a estas cifras, se ha seguido el mismo procedimiento que en el caso de MXT: dividir la señal medida para el mRNA específico de cada banda por la correspondiente, en este caso, a GAPDH (gliceraldehido 3'-fosfato deshidrogenasa) de modo que se puedan normalizar los valores de las señales (es decir, ajustar el valor de la señal de acuerdo a la carga por pocillo), ya que se asume que el gen de GAPDH se expresa de manera

constitutiva e idéntica en todas las células. Posteriormente, se divide cada resultado por el obtenido en el clon P para referir a él todas las diferencias.

PARENTAL	P2	P8	BRAIN1	B2	LUNG2	L3	BONE 2	banda
1	0,92	0,88	1,17	1,20	2,15	1,43	1,35	2MDA
1	0,85	0,78	1,00	0,63	0,96	0,77	1,04	3MDA
1	0,43	0,31	2,04	0,28	2,05	2,36	1,03	4MDA-1
1	0,41	0,26	2,00	0,56	1,28	1,78	0,76	4MDA-2
1	0,29	0,32	2,21	0,55	1,56	1,55	0,85	4MDA-3
1	0,82	0,78	1,19	1,14	2,09	1,38	1,21	5MDA
1	0,91	0,90	1,19	1,22	2,27	1,46	1,52	6MDA
1	0,57	1,54	1,58	0,62	2,04	0,59	0,46	7MDA-1
1	0,72	1,32	1,31	0,86	1,90	0,95	0,51	7MDA-2

Tabla 2.4.- Comparación de la expresión relativa de distintos mRNAs en los clones de MDA. La medida de la señal de cada banda en cada clon comparado se dividió por la correspondiente a la de GAPDH de su mismo carril, y los cocientes se dividieron, a su vez, por el cociente hallado para el clon P, de manera que los valores que aparecen en la tabla representan múltiplos de la señal de P, que a su vez se representa como 1. Para 4MDA existen tres transcritos, y para 7MDA existen dos.

Las diferencias, en el caso de 3MDA, son escasas (no llegan ni a un factor de dos entre cualquier pareja de clones que se considere). En los casos de 2MDA, 5MDA y 6MDA, las únicas diferencias notables se dan entre el clon LUNG (de células que producen metástasis en pulmón), donde la expresión es claramente superior, y todos los demás (sobre todo P y sus derivados P2 y P8).

En el caso de 4MDA, para cada transcrito con que hibrida se da una relación distinta entre los clones, lo cual significa que, si en efecto son mRNAs de una familia, la expresión de los distintos miembros sigue un patrón diferente en cada tipo celular. Lo que tienen de común es la escasa expresión de todos los mRNAs en los clones derivados de PARENTAL, y la similar expresión en esta con respecto a BONE2. Por su parte, 4MDA-1, 4MDA-2 y 4MDA-3 son más abundantes en LUNG, en su derivada L3 y sobre todo en BRAIN. Las diferencias máximas entre clones se dan entre P8 y BRAIN en las bandas 4MDA-2 y 4MDA-

3, y entre P8 y L3 en la banda 4MDA-1: en todos los casos, la diferencia alcanza un factor de alrededor de 7.

Por lo que respecta a 7MDA, también es en LUNG donde se produce una mayor expresión que en todas las demás. Para 7MDA-1 existen más diferencias considerando conjuntamente todos los clones.

En la **figura 2.9** se muestra la expresión del gen correspondiente a la banda 8MDA, aislada del segundo gel de RAP-PCR de MDA-MB 435. En este caso, de nuevo se han analizado únicamente tres clones (P, L y B), y puede observarse que la expresión en el clon Lung está virtualmente suprimida. En la misma figura se incluyen las expresiones relativas del gen en los clones L y B con respecto al clon P.

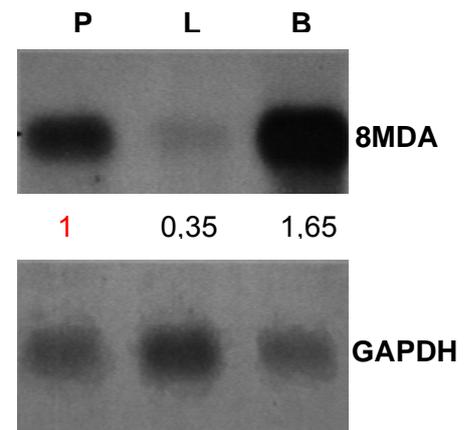
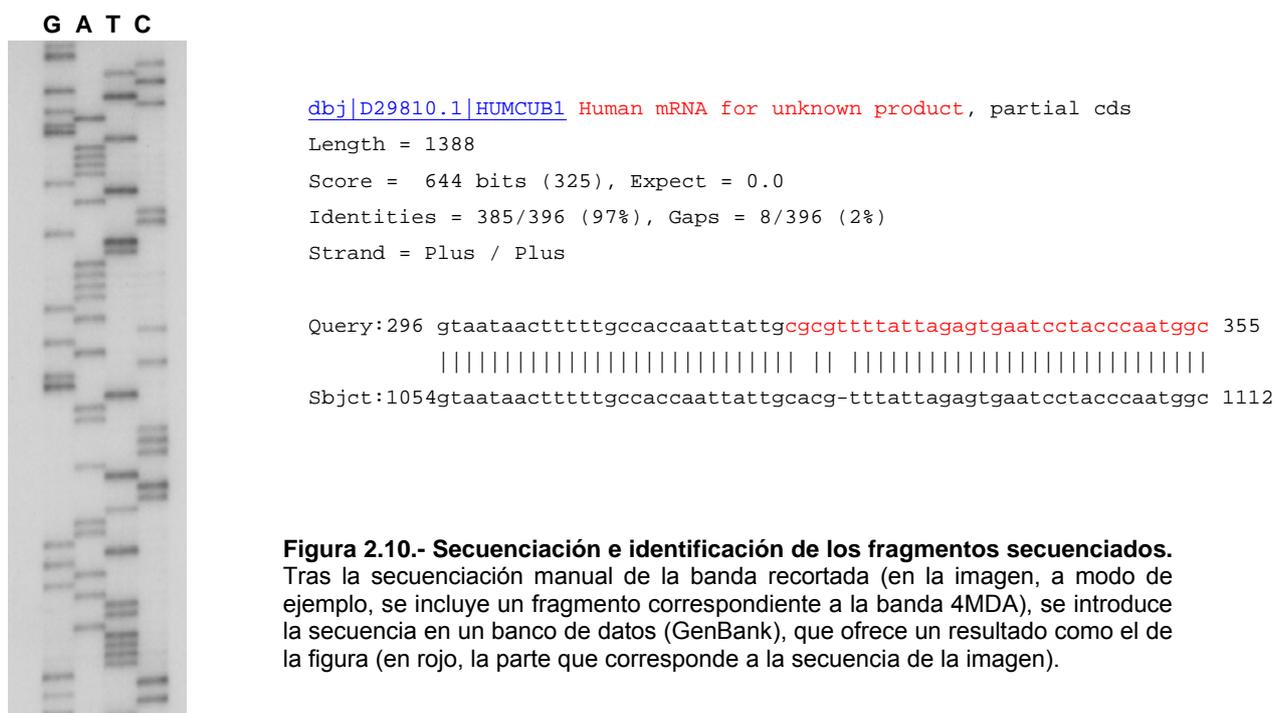


Figura 2.9.- Hibridación Northern de los clones P, L y B. Se han utilizado 15 µg de RNA poliA de cada uno y, como control de carga, se ha hibridado la membrana con GAPDH.

2.2.3.- Identificación de genes, localizados por RAP-PCR, que se expresan diferencialmente en células con distinta capacidad metastásica.

Una vez constatadas las diferencias de expresión en los distintos clones de los genes cuyo mRNA se detecta en el análisis Northern, se procede a identificarlos. Para ello, se secuencian los fragmentos de cDNA, y la secuencia que se obtiene se compara con las existentes en el banco de datos GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).



En la **figura 2.10** se observa, como ejemplo del procedimiento seguido, una imagen típica de la película obtenida tras una secuenciación (en este caso, se corresponde con un fragmento de 4MDA), de la traducción a secuencia primaria de bases y del modo en que el GenBank devuelve resultados de homologías (coincidencias) con secuencias conocidas. En rojo, está resaltado el fragmento leído en la película del ejemplo.

Las cifras que aparecen en la hoja de resultados se refieren al número de bases idénticas del total de bases enviadas (y el porcentaje correspondiente), así como al número de bases (o posiciones en la secuencia) no coincidentes con respecto al total (y su porcentaje). El programa informático calcula la probabilidad ("Expect") de que las coincidencias se deban sólo al azar. Teniendo, además, en cuenta el tamaño de la secuencia enviada y el de la secuencia completa del DNA (o mRNA) reconocido, asigna una determinada puntuación (*score*) que es directamente proporcional a la bondad de la coincidencia.

En la **Tabla 2.5** se recoge el resumen de todas las bandas secuenciadas, con sus tamaños y los DNAs o mRNAs identificados, así como los tamaños aproximados de los transcritos correspondientes detectados en el análisis Northern. Aunque los resultados que

ofrece el GenBank suelen incluir multitud de DNAs o mRNAs con los que la secuencia de la banda incógnita tiene un cierto grado de identidad, sólo se presentan en la tabla aquellos casos en que la homología es más completa y, por tanto, es más fiable su identificación con la banda.

Banda de cDNA	tamaño (pb)	tamaño RNA (kb) (Northern)	Homología observada
7MXT	386	5	gi18477347/ emb AL596130.13 Secuencia de DNA de ratón en el cromosoma 11 (del clon RP23-209O5)
16MXT	309	2,3 / 1,8	gi12805580 / gb B002270.1 mRNA de ratón similar al de la enzima E2 (variante 1) que se conjuga con ubiquitina (clone MGC:7660 IMAGE:3496088) (1715 pb)
2MDA	513	1,9	HUMENOA: mRNA de la enolasa humana (1755pb) HUMCMYCQ: mRNA humano de MBP-1 (c-myc binding protein) (1416 pb)
3MDA	484	2,8	dbjAK000261: mRNA de la proteína hipotética humana FLJ20254 (2174 pb)
4MDA	391	4,9 / 3,7 / 2,2	AF387547: mRNA de la proteína humana de células musculares lisas y endoteliales, similar a la neuropilina (ESDN) (2939 pb)
5MDA	378	2,5	dbjAK001692: mRNA de la proteína hipotética humana FLJ10830 (2643 pb)
6MDA	282	2,2	HUMAHCY: mRNA de la S-adenosil-homocisteína hidrolasa humana (2211 pb)
7MDA	254	5,7 / 4,2	NM_006614.1: mRNA de una CAM (cell adhesion molecule) humana con homología con L1CAM : close homologue of L1(CHL1(7642 pb)
8MDA	624	1,8	HUMMHHLADP: mRNA de la cadena β del antígeno linfocitario humano del MHC clase II (HLA-DP) (1501 pb)

Tabla 2.5.- Resumen de los genes identificados y las homologías observadas. La banda 7MXT presenta una perfecta homología con una zona del cromosoma 11 del ratón que todavía no se ha adscrito a ningún gen. El resto de las bandas presentan homología con diversos genes, si bien no todos conocidos.

En el caso de las células MXT, de las bandas seleccionadas, sólo la 16MXT presentaba homología con un gen conocido: un mRNA similar al de la enzima E2 (variante 1) que se conjuga con ubiquitina (gi12805580 / gb B002270.1). Existía una casi completa identidad (99%) entre las secuencias de la banda y del fragmento correspondiente del mRNA. El tamaño de éste (1,7 kb) es similar al que se calcula a partir de una de las señales observadas para 16MXT en el Northern.

La secuencia del fragmento 7MXT era homóloga (con una identidad del 99%) de una zona del cromosoma 11 de ratón. No obstante, además de la homología casi absoluta observada en esa zona, se daba también una multitud de coincidencias sólo con una

determinada parte del fragmento, lo que hacía pensar que esa parte contenía una o más secuencias repetitivas.

Las bandas seleccionadas de las células MDA-MB 435 se correspondían todas con, al menos, un cDNA o mRNA registrado con un casi total grado de identidad (siempre superior al 97%). En unos casos, estas secuencias eran de genes conocidos, y en otros aparecían reseñados como correspondientes a proteínas hipotéticas.

El fragmento 2MDA presentaba una identidad del 99% con el mRNA humano, de referencia HUMENOA en el GenBank, correspondiente a la enolasa (una enzima de la glicolisis), que tiene un tamaño similar al que se calcula a partir de la señal observada en el Northern. Se incluye también el mRNA de una proteína de unión a c-myc (*c-myc binding protein*, MBP-1, HUMCMYCQ) con la que se da un grado de identidad similar (97%).

El fragmento 3MDA solo presentaba homología con el mRNA de una proteína hipotética (dbjAK000261), no identificada todavía. El tamaño del transcrito calculado a partir del Northern no coincide con el de FLJ20254.

El fragmento 4MDA, que hibridaba en el Northern con diversos transcritos, presentaba homología con el mRNA de la proteína humana de células musculares lisas y endoteliales, similar a la neuropilina (ESDN) (AF387547). Existían otras coincidencias notables con fragmentos clonados (ESTs), y también se ha observado una identidad parcial con el mRNA del factor V de coagulación bovino (BOVFACV2A). La hibridación con diferentes transcritos probablemente se deberá a la homología con una zona concreta que pueda formar parte de distintos genes relacionados.

El fragmento 5MDA presentaba homología con un conjunto de mRNAs de proteínas hipotéticas (AK024471, AK001262, AK001983 y AK001692) aunque en la tabla sólo se incluye la última a modo de ejemplo (porque coincide en tamaño con el calculado para el transcrito del Northern: 2,5 kb).

El fragmento 6MDA se correspondía al 100% con el mRNA de la S-adenosilhomocisteína hidrolasa humana, (HUMAHCY) una enzima que participa en la reacción de regeneración del agente metilante S-adenosilmetionina (SAM). El tamaño calculado en el Northern es el esperado (2,2 kb).

El fragmento 7MDA, que hibridaba en el Northern con dos transcritos, presentaba homología con el mRNA de una proteína de adhesión celular (CHL1, NM_006614.1). Como en el caso de 4MDA, es también probable que exista más de un gen relacionado, aunque todavía no se haya identificado.

El fragmento 8MDA presentaba homología con el mRNA de la cadena β del antígeno linfocitario humano del MHC clase II (HLA-DP) (1501 pb). El tamaño del transcrito calculado a partir del Northern es similar al que se obtiene del GenBank.

En la **figura 2.11** se muestra gráficamente la ubicación de la zona homóloga de los distintos fragmentos en la secuencia completa de los cDNAs y mRNAs identificados (no se

incluyen los resultados de 7MXT). Se incluyen las posiciones dentro de las secuencias, los tamaños de los distintos fragmentos, así como el porcentaje de identidad de cada uno.

En la mayoría de los casos, el fragmento se corresponde con una posición cercana al extremo 3' del cDNA. Este es un fenómeno relativamente frecuente cuando se emplea la técnica de RAP-PCR, debido a su esencia aleatoria: conseguir un fragmento de cDNA de un tamaño razonablemente grande (por ejemplo, entre 200 y 500 pb) es tanto más probable cuanto más hacia 3' se sitúe el primer cebador sobre el mRNA, ya que el segundo debe encontrar su espacio entre el extremo 5' y el lugar en que se situó el primero. Si el primer cebador se situase en una zona más cercana al extremo 5', el espacio disponible para la ubicación del segundo sería más exiguo.

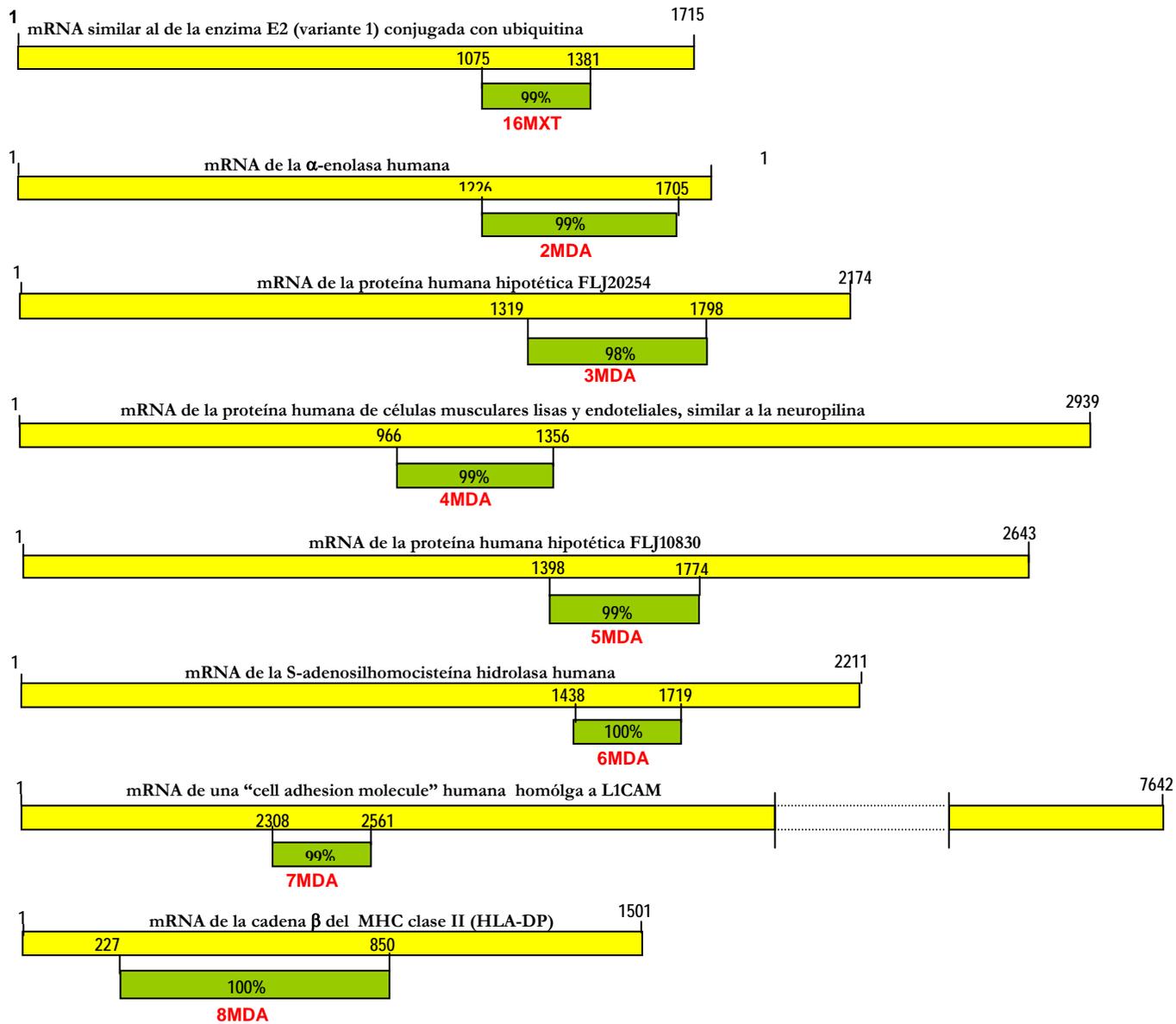


Figura 2.11.- Localización de la secuencia de las bandas analizadas sobre las correspondientes zonas homólogas de los genes identificados en el GenBank.

2.2.4.- “Caracterización” del gen 7MXT

Según los resultados obtenidos en los análisis Northern realizados con los clones MXT, el único gen de los estudiados cuya expresión es notablemente distinta entre los distintos clones es el que origina a 7MXT (entre los clones de mayor y menor expresión, la diferencia alcanzó un factor de 7). Puesto que una de las características que distingue a los distintos clones es su capacidad metastásica, que de manera determinante ha de venir dada por la expresión diferencial de algunos genes, se puede considerar *a priori* que 7MXT podría ser uno de dichos genes, y por tanto que es un candidato a intervenir en el proceso metastásico.

Dado que se trata de un gen no identificado (al menos, por lo que respecta al fragmento que se ha secuenciado), es esencial conseguir el máximo de información acerca de él. Los pasos a seguir para caracterizarlo se han dirigido, por un lado, a localizar en el organismo del ratón los lugares en que se expresa principalmente y, por tanto, las zonas en que probablemente la correspondiente proteína realiza su función; y, por otro lado, a conocer su secuencia completa (o lo más completa posible) para determinar si efectivamente es un gen desconocido o si se puede identificar.

Estos objetivos se llevan a cabo mediante el análisis del mRNA en diferentes órganos, y mediante el cribado de una genoteca de cDNA, utilizando como sonda el fragmento 7MXT.

2.2.4.1.- Estudio de la expresión de 7MXT en diferentes órganos.

Una de las primeras formas de abordar la caracterización del gen de 7MXT (que se puede llevar a cabo sin necesidad de conocer su secuencia completa), es conseguir una idea aproximada de la localización de los órganos del ratón en que se expresa, y también evaluar la medida en que lo hace en cada uno.

Para ello, se extrae mRNA de bazo, hígado, músculo, pulmón y riñón, tanto de ratón adulto como de crías, así como de intestino y ovario de adulto, y de corazón de crías. El mRNA se somete a RAP-PCR en las condiciones habituales, pero la electroforesis se realiza en agarosa para facilitar la transferencia posterior de cDNA a una membrana.

La imagen electroforética del RAP se observa en la **figura 2.12-a**. Aunque en la imagen se expone sólo una franja de tamaños, el patrón es similar al que se observaba en las imágenes de la electroforesis en poliacrilamida (la diferencia radica principalmente en la lógica pérdida de resolución). Tras su transferencia a una membrana, el cDNA se hibrida con la sonda 7MXT; el resultado se presenta en la **figura 2.12-b**. Dado que el RAP se realizó con nucleótidos radiactivos, y aunque se dejó transcurrir un tiempo para que la radiactividad disminuyera antes de la hibridación, es necesario incluir la imagen del RAP para conocer la señal de fondo y diferenciarla de la debida a la hibridación.

Puede observarse que existe una fuerte expresión en el bazo de las crías, y algo menor en el corazón; pero es de resaltar que existe también expresión en mayor o menor medida en todos los órganos probados de las crías (excepto en el hígado, aunque, dada la escasa señal en el RAP, puede sospecharse que el mRNA estaba parcialmente degradado). Sin embargo, en cuanto a los órganos de adultos, salvo una notable expresión en el ovario, y ligera en el bazo, se aprecia una ausencia casi absoluta (al menos en los órganos probados).

Por tanto, parece tratarse de un gen de actividad ubicua (si bien no homogénea) en el período perinatal, que va perdiendo para especializarse en el ovario en los ratones adultos. Aunque no se ha podido demostrar, es de prever que también existirá expresión en el ovario de las crías.

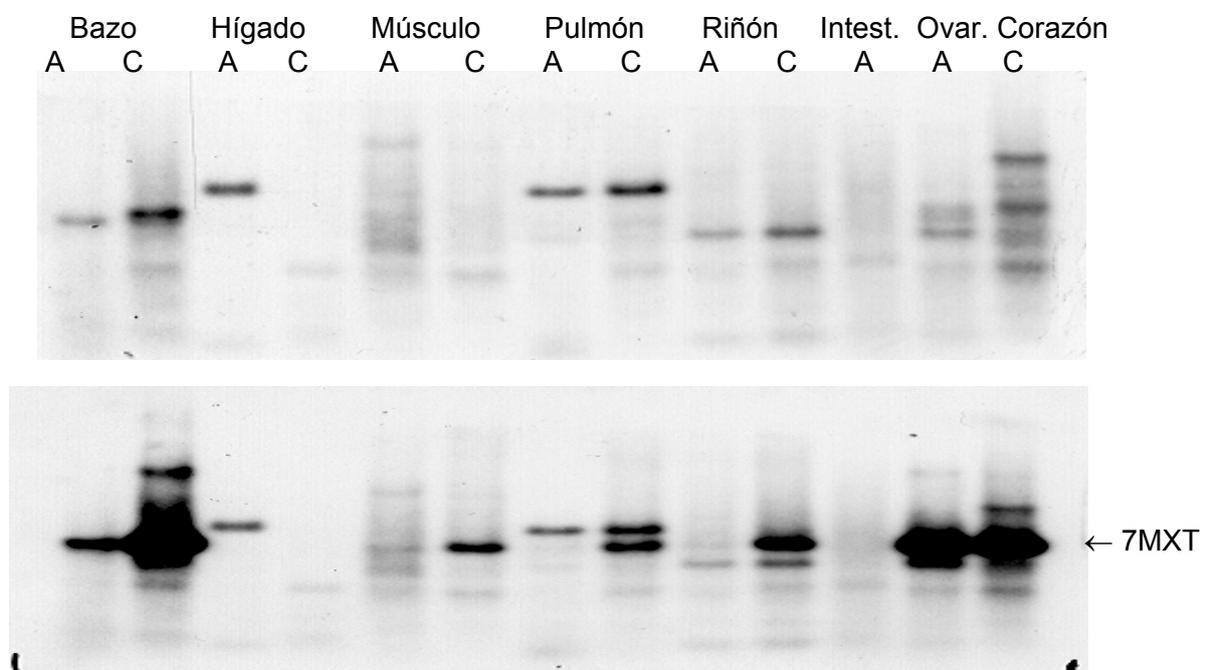


Figura 2.12.- Expresión de 7MXT en diferentes órganos. De los distintos órganos (tanto de adulto, A, como de cría, C) que se han estudiado, la expresión de 7MXT era abundante en el bazo y el corazón de las crías, y en el ovario de los animales adultos. En el resto de los órganos de las crías había una leve expresión, y prácticamente nada en los órganos adultos.

2.2.4.2.- Cribado de una genoteca de cDNA (del clon S15) con la sonda 7MXT.

Al mismo tiempo que se localizaban los órganos en que se expresaba el gen del que procede el fragmento 7MXT, se intentaba conseguir su secuencia completa para poder identificarlo, si es que estaba incluido ya en el GenBank, o describirlo como un gen nuevo.

De los distintos métodos existentes para aislar fragmentos de DNA que contengan la secuencia completa (o casi completa) de un gen del cual ya se conoce una parte, se eligió realizar un cribado de una genoteca de cDNA, preparada a partir de mRNA del clon S15, que es (aparte del E₂) el clon en que más se expresa dicho gen. Las sondas empleadas para realizar este cribado se detallan en la **figura 2.13**. Mediante un previo RACE (amplificación rápida de extremos de cDNA, que es otro de los métodos antes mencionados), se había podido conocer la prolongación del fragmento 7MXT hacia su extremo 3'. El resultado fue la secuencia 7A. Por otro lado, puesto que, tras la búsqueda de homología en el GenBank, sólo se encontraron identidades con una determinada zona de 7MXT (aunque muy numerosas, lo que hacía pensar en una secuencia repetitiva), se utilizó también, como supuesta sonda más específica, el fragmento interno 089-222, que, aunque de sólo 134 pb, no presentaba homología con ninguna secuencia conocida al introducirla en el GenBank.

```
ttacacttctacctgtttcccactgtgtactccaggctagctggcctgtgagctattgtccctcctcctctggcttcccatgggatttagagattgaact  
gggcctaacactgtgtagcagcgtttaccacagccatcctcctagctctagctgtggcctttatcagatctgtattattatttagtagcctcccagct  
aattccctgcagtggtctctctcctttggagacagacagggtttctgtgtagaacagactgtcctggaacacagagagccacctgccttgcccc  
gcctaattgcaggattaaagctttcaccacgatgtctggctgacattgttttctcctcaagttaacttagtcaacactgcctcctgagatactcacaga  
tacagaattctctgccttctgccacaggcaggcatctctggttactataattagcatcacttccgatggagggaagcagactttcactactgtctttcatg  
cagagtagctgttttagagactgcctatagatgaagagcagtttaaggatttttctcaccacaaatactattcctcctgtaataatagaaaa  
aagtagggctggagaaatagctcaacagttaagaggcactggcagttagttcctctagaggactcaggttgaatccagcatccacatgccagctc  
acaactgtctgtgatccaactgtaaagtatccaaaactccag
```

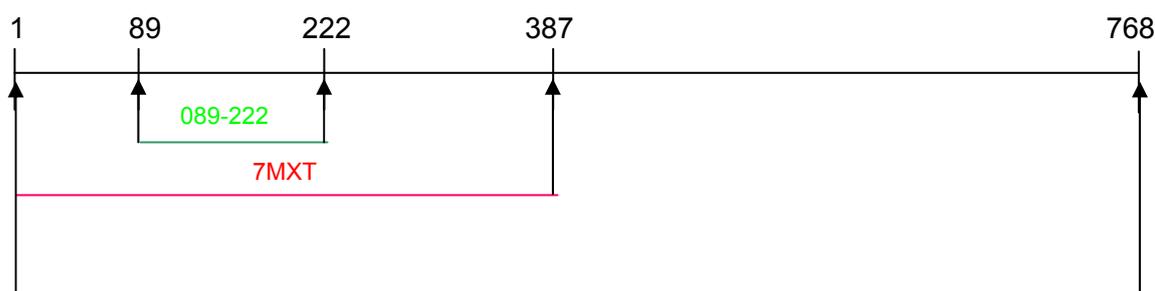


Figura 2.13.- Sondas empleadas en el cribado de la genoteca S15 de cDNA. El fragmento 7MXT inicial fue prolongado por su extremo 3' mediante RACE (amplificación rápida de extremos de cDNA) hasta obtener el fragmento 7A, también utilizado como sonda. Asimismo, se empleó como sonda el fragmento 089-222, correspondiente a una zona de 7MXT de la que no se conocía la existencia de homología alguna con zonas repetitivas en el GenBank.

En la **figura 2.14** se observa un ejemplo del tipo de resultado obtenido tras una hibridación de cribado. Prácticamente todas las colonias hibridaban, aunque con distinta intensidad. Se escogieron y aislaron diversas colonias de virus que ofrecían una señal más intensa (con la esperanza de que se correspondieran con una hibridación más completa y perfecta), y se determinó la secuencia de los cDNAs insertados en el DNA viral. El tamaño de estos cDNAs era, en general, bastante grande (entre 2 kb y 4 kb) y no se secuenciaron enteros, sino sólo los extremos (entre 400 pb y 600 pb en total, por término medio), ya que se consideró que sería suficiente para identificar el inserto mediante consulta en el GenBank.

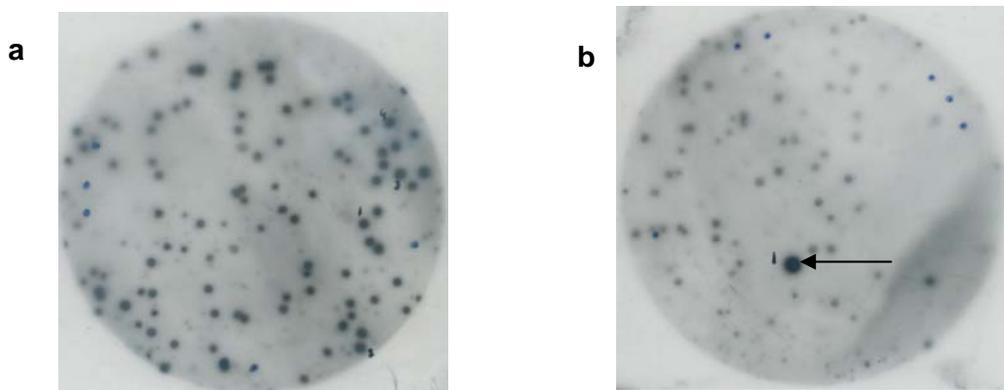


Figura 2.14.- Cribado de la genoteca S15 con las sondas 7MXT y derivados. La hibridación de las membranas que contenían cDNA de los diferentes clones víricos de la genoteca era, en general, poco específica (**a**). Se escogieron, para estudiar su cDNA, aquellas calvas que presentaban una señal más intensa (flecha en **b**), asumiendo que, dado que el tamaño de las calvas era muy similar, la hibridación había de ser más completa en estos casos.

Los resultados de esta búsqueda se resumen en la **Tabla 2.6**. En ella se especifica, para cada colonia estudiada, el tamaño de la secuencia leída por cada extremo junto con el porcentaje de identidad con el mRNA correspondiente encontrado en el GenBank (el de mayor identidad de los resultantes de la búsqueda).

Clon	tamaño mRNA (kb) (Northern)	Identidad de secuencia	Homología (identificación del GenBank)
121	3,1	5': 635/668 (95%)	AF307844: Mus musculus epithelial protein lost in neoplasm-a (Eplin-a) mRNA, (3997 nt)
		3': 641/689 (93%)	
623	3,0	5': 311/315 (99%)	S47577: moesin homolog [mice, teratocarcinoma F9 cells, mRNA, 3835 nt]
		3': 71/73 (97%)	
4312	4,0	5': 323/341 (94%)	Mus musculus 13 days embryo heart cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:D330001L02 product:SARCOLEMMAL ASSOCIATED PROTEIN-3 homolog [<i>Oryctolagus cuniculus</i>]
		3': 82/102 (80%)	OCU21157: Mus musculus sarcolemma associated protein (Simap), mRNA (3288 nt)
1111	-	5': 266/272 (98%)	AB033615: Mus musculus mRNA for phospholipase C-L2 (4185 nt)
		3': 231/251 (92%)	
1112	4,0/3,5/3,0	5': 211/227 (93%)	MMU33005: Mus musculus tre-2/USP6, BUB2, cdc16 domain family, member 1 (Tbc1d1), mRNA (4039pb)
		3': 229/242 (94%)	
151	2,3	5': 197/198 (99%)	S64860: NonO=non-POU domain-containing octamer-binding protein [mice, B-cell leukemia, BCL1, mRNA, 2411 nt]
		3': 64/111 (58%)	
3121	1,7	5': 194/242 (80%)	MUSEFTU: Mus musculus protein synthesis elongation factor Tu (eEF-Tu, eEf-1-alpha) mRNA (1722 nt)
		3': 233/256 (91%)	

Tabla 2.6.- Genes identificados tras el cribado de la genoteca S15 con las sondas de 7MXT y derivados. Los fragmentos clonados (a los que se ha dado una numeración arbitraria) no se secuenciaron completamente, sino solo por ambos extremos, lo suficiente para identificar los insertos. En la Tabla, se muestran las identidades más relevantes (casi siempre superiores al 90%). En general, se pudo establecer una correspondencia aproximada entre el tamaño del cDNA publicado en el GenBank y el tamaño del RNA reconocido por los insertos, calculado a partir de una hibridación Northern (figura E2). El cDNA del clon 1112 reconocía mRNAs de tres tamaños distintos. Con el cDNA del clon 1111 no se probó la hibridación.

Por otro lado, en la tabla también se incluye el tamaño aproximado del transcrito, calculado tras la hibridación Northern con el inserto secuenciado. Los tamaños de mRNA se corresponden aproximadamente con los resultados de la búsqueda. En el caso de la colonia 1112, la secuencia identificada parece ser una región común a una familia de genes, lo que explica que se dé una hibridación (Northern) con al menos tres transcritos.

Puesto que se buscaba identificar un gen, del cual en principio sólo se conocía, por un lado, una parte de su secuencia, y por otro su patrón de expresión en un grupo de clones

celulares, la manera más inmediata de reconocer si alguno de los genes localizados era el buscado, consistía en observar si la hibridación Northern de todos ellos con los mismos clones celulares, en las mismas condiciones, ofrecía el mismo patrón de expresión que el de 7MXT.

En la **figura 2.15** puede observarse la expresión (mediante la imagen Northern) de los distintos genes que hibridan con los insertos de las colonias seleccionadas, y en la **Tabla 2.7** (confeccionada siguiendo el mismo procedimiento que para las Tablas 2.3 y 2.4) se detallan las relaciones numéricas entre la expresión de los genes, en los clones celulares seleccionados, con respecto a las células parentales.

En ninguno de los casos, el patrón de expresión Northern se corresponde con el observado para la sonda 7MXT (que se había repetido varias veces). Aunque no se debe descartar la posibilidad de que algún cambio en las condiciones ambientales (de cultivo) origine patrones de expresión distintos para un mismo gen, puede suponerse que ninguno de los genes identificados es el origen de la banda 7MXT.

S	E2	S10	S12	S13	B2	C1.1	banda	gen
1	1,20	0,09	0,98	2,24	1,38	2,05	121	Eplin
1	3.33	1.37	1.62	1.38	2.02	1,97	623	Moesina
1	1,43	0,93	1,31	3,00	1,14	2,38	4312	Slmap
1	0,02	1,36	1,08	2,14	1,07	1,41	3121	eEF-1α
1	1,29	0,94	1,45	4,87	0,89	0,82	1151	NONO

Tabla 2.7.- Comparación de la expresión relativa de los genes identificados. La medida de la señal de cada banda se dividió por la correspondiente al GAPDH de su mismo carril, y los cocientes se dividieron, a su vez, por el cociente hallado para el clon S, de manera que los valores que aparecen en la tabla representan múltiplos de la señal de S. La numeración de las bandas es arbitraria.

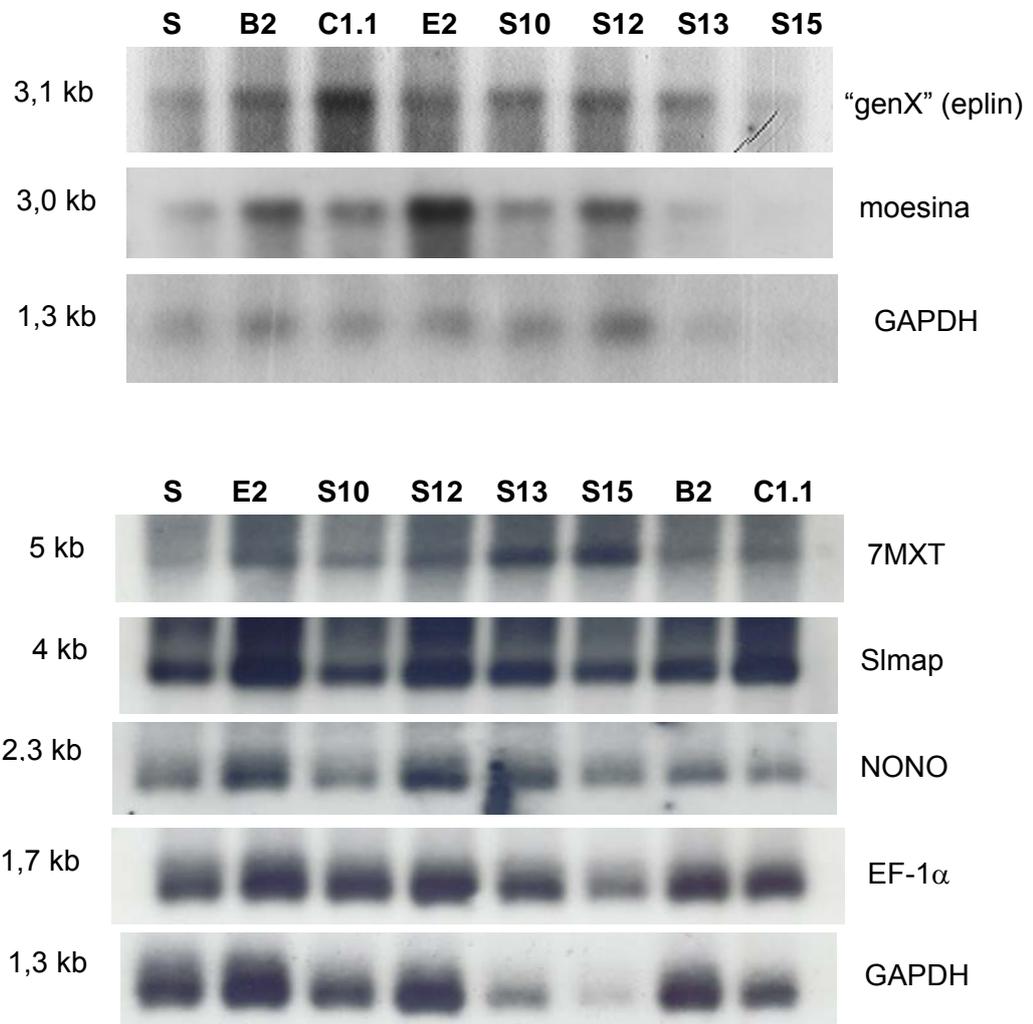


Figura 2.16.- Expresión de los genes identificados tras el cribado con 7MXT en los distintos clones en estudio. La hibridación Northern se ha hecho en dos membranas distintas debido a su vida limitada. La comparación numérica entre las distintas señales se analiza en la Tabla 2.7.

2.2.5.- Nuevos genes candidatos asociados al fenotipo metastásico.

Aunque mediante el cribado de la genoteca de cDNA de S15 no se ha podido conocer la secuencia completa del gen correspondiente al fragmento 7MXT, sí se ha podido observar una expresión diferencial (entre los clones de distinta capacidad metastásica) de algunos de los genes identificados en el cribado. Esto permite considerar la posibilidad de que estén relacionados con el proceso metastásico. En la **Tabla 2.7** se exponía la expresión relativa de estos genes comparada entre los distintos clones. Se ha considerado que las diferencias podían ser significativas cuando existía, al menos, un factor de 2 entre las expresiones de un clon metastásico frente a uno no metastásico.

De los genes identificados en este primer cribado de la genoteca S15, hubo uno que había recibido la denominación de Gen X, y que correspondía a un fragmento de unos 3 kb fusionados al extremo 3' de una variante del gen de la SREBP-2 (*sterol regulatory element binding protein-2*). Posteriormente ha sido identificado como un gen independiente, y denominado eplin (*Epithelial protein lost in neoplasm*). En su momento, el hecho de presentar una expresión diferencial entre los distintos clones estudiados, así como su condición de fragmento fusionado y relativamente desconocido, le prestó el atractivo suficiente para continuar su estudio. El que a posteriori se haya publicado su supuesta relación con la presencia de tumores corrobora que la elección de estudiarlo estaba fundamentada.

Se ha realizado un nuevo cribado de la genoteca S15, en las mismas condiciones que el anterior, con la sola variación de la sonda: en este caso se emplea un fragmento del cDNA del Gen X (eplin) obtenido mediante PCR. Se han aislado de nuevo las colonias virales cuya hibridación era más intensa. Como resultado, se han obtenido diversos clones virales con insertos de distinto tamaño.

En la **Tabla 2.8** se presentan los genes identificados tras comparar las secuencias leídas (por los extremos 5' y 3' de los insertos) con las existentes en el GenBank. El hecho más llamativo fue que, en diversos casos, se observaba una homología con genes distintos en cada extremo, como si los insertos estuvieran compuestos por (al menos) dos fragmentos diferentes de cDNA. Algunas combinaciones fueron especialmente frecuentes, en particular la de la proteína ERP - HGF (factor de crecimiento de hepatocitos).

En realidad, los únicos insertos con extremos homogéneos fueron los correspondientes, por un lado, al propio Eplin, y, por otro, al cDNA (mRNA) de ADAMTS1 (si bien por el extremo 3', la homología que se muestra es con el gen, y no con el mRNA, porque en el GenBank está introducido un cDNA más corto que el obtenido en el presente trabajo).

Clon	identidad de secuencia	Homología (código de GenBank)
1111	5': 203/210 (97%)	NM_007952.1: Mus musculus endoplasmic reticulum protein (Erp)
	3': 224/229 (98%)	MUSHEPGFA: Mouse hepatocyte growth factor-like protein
1131	5': 245/256 (89%)	NM_005872.1: Homo sapiens breast carcinoma amplified sequence 2 (BCAS2)
	3': 272/279 (97%)	
1132	5': 173/177 (98%)	AF307845: Mus musculus epithelial protein lost in neoplasm-a (Eplin)
	3': 142/148 (95%)	Similar to hypothetical gene LOC150274
1311	5': 210/213 (99%)	AF209906: Mus musculus receptor (calcitonin) activity modifying protein 2(Ramp2)
	3'	-
1421	3': 267/287 (93%)	AF291064: Mus musculus Stat3-interacting protein
1422	5': 203/210 (97%)	BC004708.1: Mus musculus general transcription factor III C 1, mRNA
	3': 291/312 (93%)	NM_021448.1: Mus musculus signal transducer and activator of transcription 3 interacting protein 11 (Stat3ip1-pending)
1431	5': 271/281 (96%)	D83999: Mus musculus mRNA for the third largest RNA polymerase II subunit
	3': 264/293 (90%)	NM_009090.1: Mus musculus RNA polymerase II 3 (Rpo2-3)
1441	5': 315/321 (98%)	D67076: Mouse mRNA for secretory protein containing thrombospondin motifs (ADAMTS1)
	3': 408/411 (99%)	AB001735: Mus musculus DNA for ADAMTS1

Tabla 2.8.- Genes identificados tras cribar la genoteca S15 con la sonda "eplin". Los cDNAs clonados a partir de la genoteca se secuenciaron por ambos extremos para identificarlos. El análisis de las características de los genes identificados sirvió para seleccionar uno de ellos (ADAMTS1) para su estudio posterior.

**3.- ESTUDIO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LA INFLUENCIA DE ADAMTS1
SOBRE CARACTERÍSTICAS ASOCIADAS AL FENOTIPO METASTÁSICO**

3.1.- INTRODUCCIÓN

En el capítulo 2 se ha expuesto la búsqueda de genes relacionados con la metástasis en el cáncer de mama mediante un método (RAP-PCR) basado en la observación de supuestas diferencias de expresión de genes anónimos entre células de distinta capacidad metastásica, y a continuación su identificación, y el cribado de una genoteca de cDNA para obtener la secuencia completa de los cDNAs diferencialmente expresados. Como consecuencia de este cribado, se ha obtenido una serie de genes de características diversas. Una vez analizadas estas, teniendo en cuenta sus posibilidades a priori de intervención en procesos de invasión o de metástasis, así como la diferencia concreta de expresión en los clones celulares analizados, se ha decidido continuar el estudio de algunos de ellos.

Uno de los genes identificados durante el cribado de la genoteca S15 fue el de ADAMTS1. Las proteínas de la familia ADAM (*a desintegrin and metalloproteinase*), tienen una estructura que permite pensar en su posible intervención en procesos metastásicos, ya que una parte de la molécula (la metaloproteínasa) tiene capacidad degradadora de las proteínas, y otra (la desintegrina) podría permitir la fijación entre proteínas o con determinados componentes de la matriz extracelular. Por tanto, se decidió realizar un análisis de la expresión de ADAMTS1 en los clones de MXT.

En la **figura 3.1** se observa el resultado de la hibridación Northern, tanto gráfica como numéricamente. Teniendo en cuenta las grandes diferencias que se dan entre los distintos

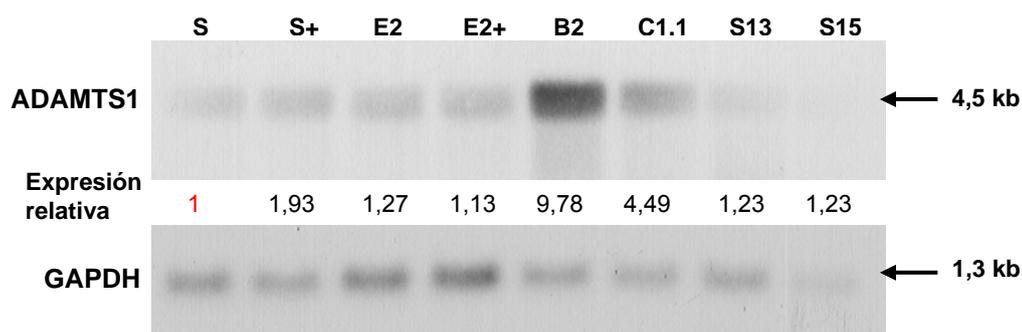


Figura 3.1.- Expresión de ADAMTS1 y GAPDH en los clones en estudio. Tras la hibridación Northern, se comparan las señales relativas entre los distintos clones y se observa que existen notables diferencias entre los más metastásicos (B2 y C1.1) y el resto. Los clones S+ y E2+ son de células crecidas con estradiol, mientras que el resto no lleva.

clones (gran expresión en los que son muy metastásicos, como C1.1 y B2; poca expresión en los poco metastásicos, como S13 y S15), se sospechó que este gen podía tener un papel importante en el proceso de metástasis y, por tanto, se preparó un estudio más detallado

para saber si la variación de su expresión podía influir en algunas de las características funcionales que determinan la capacidad invasiva o metastásica de las células.

Al haberse observado una asociación entre la alta expresión del gen y la alta capacidad metastásica de determinados clones, una manera muy útil de saber qué importancia tiene dicha expresión es tratar de invertirla en esos clones.

Así, por ejemplo, si tenemos un clon con una gran capacidad metastásica y una alta expresión del gen, se trata de bloquear la expresión de dicho gen (manteniendo todas las demás características de crecimiento celular iguales) y observar si la capacidad metastásica varía (disminuye); y, al contrario: si tenemos un clon con una baja capacidad metastásica y una escasa expresión del gen, se trata de provocar el aumento de la expresión (manteniendo todas las demás características de crecimiento celular iguales) y observar si la capacidad metastásica aumenta.

La evaluación *in vitro* de la capacidad metastásica se realiza mediante el estudio de características relacionadas con la capacidad invasora de las células (por ejemplo, la capacidad de adhesión a componentes de la matriz extracelular) y a la posibilidad de migración.

Para bloquear la expresión del gen candidato en las células que lo expresan, estas se transfectan de manera estable con cDNA antisentido (del mismo gen) incluido en un plásmido. Para aumentar la expresión del gen candidato en las células que no lo expresan (o lo hacen poco), estas se transfectan con un cDNA en sentido (del mismo gen) incluido en un plásmido.

El vector plasmídico lleva una resistencia a un antibiótico, que permite la selección de las células que lo han incorporado. Una vez seleccionados los clones celulares y comprobado (mediante análisis de Southern y Northern) que las células cumplen el previsto cambio en la expresión del gen candidato, ya se pueden establecer comparaciones entre ellas por lo que respecta a las características relacionadas con la capacidad metastásica.

En dichas comparaciones se toman como referencia las células sin transfectar, y se evalúa si existe un cambio significativo de las características estudiadas en las células transfectadas.

3.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1.- Cribado de la genoteca de cDNA de S15 con sondas de ADAMTS1

Se sigue el mismo procedimiento explicado en el apartado 2.1.11. Se obtienen membranas por duplicado, y las sondas que se emplean son específicas del cDNA de ADAMTS1. En concreto, se utiliza en primer lugar el fragmento [1003-3326], que se obtiene por PCR a partir de la genoteca de cDNA del clon S15, según las siguientes condiciones:

Componentes	Volumen por muestra (μL)	Concentración final
cDNA	2	
Cebador 1003: 5'-AGTGC GGCGTCATGGACGA-3' (100 μmol/L)	0,25	1 μmol/L
cebador 3326: 5'-TCCCCACGCTACCTTGTC-3' (100 μmol/L)	0,25	1 μmol/L
"Tampón 10X" (Roche) Tris-HCl 100 mmol/L KCl 500 mmol/L MgCl ₂ 15 mmol/l	2,5	"1X" Tris-HCl 10 mmol/L KCl 50 mmol/L MgCl ₂ 1,5 mmol/L
dNTPs (1 mmol/L)	2,5	0,1 mmol/L
Taq polimerasa (5U/μL) (Roche)	0,25	1,25 U
H ₂ O	17,25	
Vol. final	25	

Programa:

95 °C	30 s	
94 °C	1 min	35 veces
65 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	5 min	

Para comprobar que las calvas (virus) recortadas contienen el inserto de ADAMTS1, se someten a la misma PCR usada para obtener la sonda. Si se dan productos del tamaño esperado (2324 pb), se asume que el inserto contiene, como mínimo, el fragmento [1003-3326], aunque la comprobación definitiva es la secuenciación de los extremos. Sin embargo, para ahorrar el trabajo de obtener muchos fásmidos y secuenciar muchos insertos, se realiza una segunda hibridación (con los duplicados de las membranas), que es complementaria de la primera porque se emplea como sonda el fragmento [1-1021]. Las calvas que hibridan ahora se comparan con las que hibridaban antes, y aquellas que sean comunes probablemente contendrán un inserto más extendido hacia 5', o, como mínimo, se podrán descartar algunas calvas con virus cuyos insertos no contienen el extremo 5' del cDNA de ADAMTS1.

La sonda [1-1021] también se obtiene mediante PCR, en las mismas condiciones que la anterior, salvo que se usan los cebadores [1]: 5'-gcagctccga gctaggtgc-3' y [1021]: 5'-tcgtccatgacgccgact-3'.

Las secuencias de todos los cebadores de ADAMTS1 empleados en este trabajo se recogen en la tabla 3.1.

Nombre	Secuencia	Sentido
DES-1	gcagctccgagctaggtgc	→ 3'
DES-1003	agtgcggtcatggacga	→ 3'
DES-1122	ggaccaggaagcataaggaag	→ 3'
DES-1330	acgaggagcagaaggacca	→ 3'
DES-329	ctctacgctctaaacgtc	→ 3'
DES-423	cagaagccctgctccgac	→ 3'
DES-521	aatgctgctatgtgcggg	→ 3'
DES-607	gccacgattccaccacca	→ 3'
DES-790	gcacggtgaacggtgatcc	→ 3'
DES-462	ctgcccgtggacgtcc	→ 5'
DES-489	gtgaggacagagagcccc	→ 5'
DES-1021	tcgtccatgacgccgact	→ 5'
DES-1773	ccccgtgtccattatctagga	→ 5'
DES-2058	tagcaaaatgcttcagtctgtc	→ 5'
DES-2954	tgtgggaatggcgttgaatga	→ 5'
DES-3326	tccccacgtaccttgc	→ 5'
DES-3536	gtgcttggggctccttagt	→ 5'
DES-3867	tggtgtaagaagaaatcaggag	→ 5'

Tabla 3.1.- Cebadores empleados en las PCRs y las secuenciaciones

3.2.2.- Secuenciación de ADAMTS1

Después de seleccionar calvas mediante el cribado de la genoteca, se obtienen los fásmidos correspondientes (según se explica en el apartado 2.1.11.7). Sin embargo, el hecho de que exista hibridación con determinados fragmentos no garantiza que se tenga un cDNA completo. Para determinar hasta qué punto lo son los diversos insertos (es decir, en qué posición de la secuencia publicada en el GenBank empieza o acaba el inserto), se lleva a cabo la secuenciación de sus extremos empleando los cebadores M13 forward y M13 reverse (ver apartado 2.1.7).

3.2.3.- Preparación de construcciones anti-ADAMTS1.

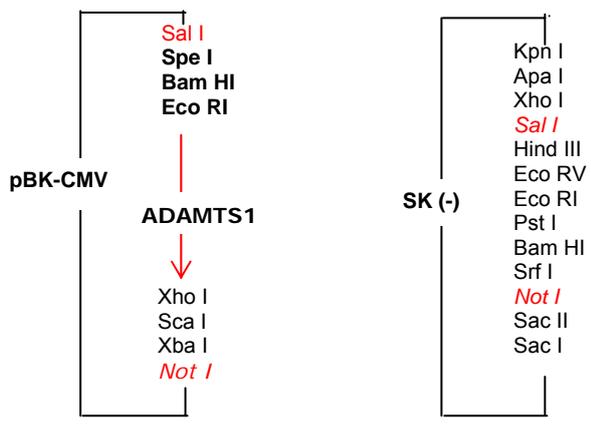
Una vez obtenido un fásmido que contiene un inserto con la secuencia casi completa del cDNA de ADAMTS1, se trata de conseguir introducirlo en un vector plasmídico que permita la expresión del RNA antisentido que bloquee la producción de ADAMTS1 en las células elegidas (las B2, de notable expresión de ADAMTS1).

Este proceso se lleva a cabo en las siguientes etapas.

3.2.3.1- Clonación en vectores pCR-SK(-)

El cDNA de ADAMTS1 está insertado en el fásmido pBK-CMV según se observa en el esquema de la figura, donde la flecha indica la orientación 5'→3'. También puede

observarse la disposición de las dianas de restricción en el poliligador del plásmido pCR-Script™ SK(-). Al digerir fásmido y plásmido con Sal I y Not I (Roche), queda abierto el plásmido SK (-), y liberado el inserto de ADAMTS1, ambos con extremos compatibles. Como el inserto y el fasmido tienen un tamaño muy parecido (unas 4,5 kb), el fásmido se digiere, a la vez con Bgl I (Roche), lo que produce varios fragmentos pequeños, perfectamente distinguibles del inserto. Las mezclas de reacción para la digestión son:

	Fásmido ADAMTS1	10 µL
	Sal I	1 µL
	Not I	1 µL
	Bgl I	1 µL
	Tampón H (10X)*	4 µL
	H ₂ O	23 µL
	y	
	Plásmido pCR-Script™ SK(-)	5 µL
	Sal I	1 µL
	Not I	1 µL
	Tampón H (10X)*	2,5 µL
	H ₂ O	15,5 µL

Se incuban a 37 °C durante toda la noche.

*Composición del tampón H (10X): Tris-HCl 50mM, MgCl₂ 10mM, NaCl 0,1M.

Tras la digestión, los productos se separan electroforéticamente en un gel de agarosa (1%)/TBE, se recorta la banda correspondiente al inserto ADAMTS1 y se purifica con columnas de filtro (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, AmershamPharmacia), siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido linealizado también se filtra por las columnas, para eliminar fragmentos pequeños de DNA (resto del poliligador) y sales.

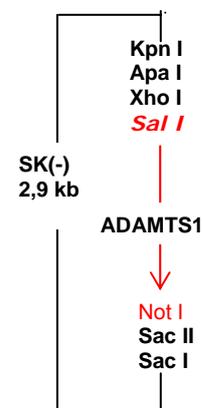
Los productos purificados se someten a una ligación en la siguiente mezcla de reacción:

DNA ADAMTS1	3 µL
Plásmido pCR-Scipt™ SK(-)	3 µL
Ligasa T4 (Roche)	1 µL
Tampón 10X*	1 µL
H ₂ O	2 µL

*Composición del Tampón 10X: Tris-HCl 50mM, EDTA 1mM, ATP 1µM, ditioeritritol 5mM.

Esta mezcla se deja en incubación toda la noche a 16 °C.

La construcción esperada es la que se presenta en la figura.



Para conseguir la clonación del producto de la ligación, ADAMTS1-SK(-), se introduce en bacterias XL1-Blue (que previamente han sido hechas competentes mediante tratamiento con CaCl₂) en las siguientes condiciones.

Bacterias XL1-Blue	100 µL
ADAMTS1-SK(-)	10 µL

Esta mezcla se mantiene en hielo durante 30 minutos. A continuación, se pone a 42 °C (2 minutos) para someter a las bacterias a un choque térmico y facilitar la entrada del plásmido a su interior. Después se añaden a la mezcla 500 µL de solución LB y se mantiene 1 hora en agitación a 37 °C. Tras sembrar placas de agar-LB con ampicilina (50mg/L) y X-Gal, y hacerlas crecer a 37 °C durante 18 horas, se colocan a 2-8 °C durante al menos 2 horas. Las colonias formadas toman color azul, si no han incorporado plásmidos o estos son sin inserto, y blanco si el plásmido incorporado tiene inserto.

Se seleccionan colonias blancas y se siembran por separado, cada una en 4 mL de LB líquido con ampicilina (50 mg/L). Cuando han crecido ligeramente, se ponen 10 µL en un tubo de microcentrífuga, se diluyen 1/10 con agua bidestilada, se calienta todo a 100 °C durante 10 minutos y luego se centrifuga 5 minutos a 15000g. El sobrenadante se emplea como sustrato en una PCR de comprobación de la existencia del inserto, igual a la empleada en el apartado 1, con la única diferencia de que se utilizan los cebadores [1122]: 5'-agtgcggcgctcatggacga-3' y [2058]: 5'-tagcaaaatgcttcatgtctgtc-3'. Si el producto obtenido es del tamaño esperado, se considera que la transformación ha sido buena y se deja crecer más el cultivo bacteriano, para luego obtener el plásmido.

La obtención del plásmido se hace con el equipo GFX™ Micro Plasmid Prep Kit de Pharmacia, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para comprobar que el inserto está completo, los plásmidos se digieren con las enzimas de restricción Bam HI y Kpn I, con las siguientes mezclas de reacción:

ADAMTS1-SK(-)	2 µL		ADAMTS1-SK(-)	2 µL
Tampón 10X	2 µL		Tampón 10X	2 µL
Bam HI	1 µL	y	Kpn I	1 µL
BSA (10X)	2 µL		BSA (10X)	2 µL
H ₂ O	13 µL		H ₂ O	13 µL

dejando en incubación a 37 °C toda la noche. Los productos de la digestión se separan electroforéticamente en un gel de agarosa (1%)/TBE.

3.2.3.2.- Clonación en el vector pZeoSV2(+)

El cDNA de ADAMTS1 está insertado en el plásmido pCR-Script™ SK(-) según se observa en el esquema. También se muestra la disposición de las dianas de restricción en el poliligador del plásmido pZeo-SV2. Al digerir los plásmidos con Apa I y Not I (Roche), queda

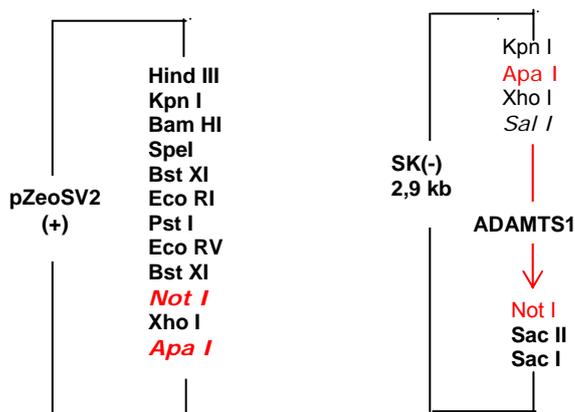
abierto el pZeo-SV2 y liberado el inserto de ADAMTS1, ambos con extremos compatibles.

Las mezclas de reacción para la digestión son:

ADAMTS1-SK(-)	10 µL	pZeoSV2(+)	3 µL
Apa I	1,5 µL	Apa I	1,5 µL
Not I	1,5 µL	Not I	1,5 µL
BSA (10X)	4 µL	BSA (10X)	3 µL
Tampón H (10X)	4 µL	Tampón H (10X)	3 µL
H ₂ O	19,5 µL	H ₂ O	18 µL

Se incuban a 37 °C durante toda la noche.

Tras la digestión, los productos se separan por electroforesis en un gel de agarosa (1%)/TBE, se recorta la banda correspondiente al inserto ADAMTS1 y se purifica con columnas de filtro (GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los plásmidos linealizados también se filtran a través de las columnas, para eliminar fragmentos pequeños de DNA (resto del poliligador) y sales.



Los productos purificados se someten a una ligación en la siguiente mezcla de reacción:

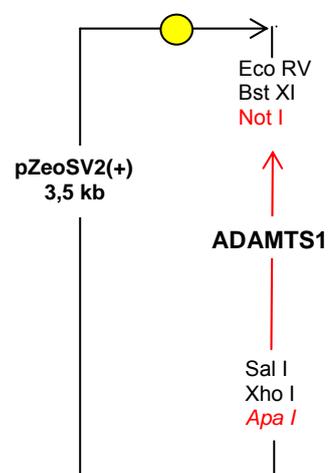
ADAMTS1	5 µL
Plásmido pZeoSV2(+)	1 µL
Ligasa T4	1 µL
Tampón 10X	1 µL
H ₂ O	2 µL

Esta mezcla se deja incubando toda la noche a 16 °C.

La construcción esperada es la que se muestra en el esquema. El círculo amarillo representa el punto de inicio y la flecha la dirección de la transcripción.

Para conseguir la clonación del producto de la ligación, ADAMTS1-pZeoSV2(+), se introduce en bacterias DH5α (que previamente han sido hechas competentes mediante tratamiento con CaCl₂) en las siguientes condiciones:

Bacterias DH5α	100 µL
ADAMTS1-pZeoSV2(+)	10 µL



Esta mezcla se mantiene en hielo durante 30 minutos. A continuación, se pone a 42 °C (2 minutos) para someter a las bacterias a un choque térmico y facilitar la entrada del plásmido a su interior. Después se añaden a la mezcla 500 µL de solución LB y se mantiene 1 hora en agitación a 37 °C. Por último, se siembran placas de agar-LB con zeocina (50mg/L) y se hacen crecer a 37 °C durante 18 horas. Sólo las bacterias que hayan sido transformadas por los plásmidos serán resistentes a la zeocina y podrán, por tanto, formar colonias.

La selección de las colonias, su crecimiento, la comprobación (mediante PCR) de que contienen plásmidos con inserto, y la posterior obtención del plásmido, se llevan a cabo como se explica en el apartado anterior.

Para comprobar que el inserto está completo, los plasmidos se digieren con la enzima de restricción Xho I, con la siguiente mezcla de reacción:

ADAMTS1-pZeoSV2(+)	2 µL
Tampón (H) 10X	2 µL
XhoI	1 µL
BSA (10X)	2 µL
H ₂ O	13 µL

dejando en incubación a 37 °C toda la noche. Los productos de la digestión se separan electroforéticamente en un gel de agarosa (1%)/TBE.

Una vez comprobado que los insertos son del tamaño adecuado, se procede a la producción de una mayor cantidad de cada plásmido. Para ello, se utiliza el equipo FlexiPrep®Kit de Amersham Pharmacia, siguiendo las instrucciones del fabricante, y partiendo de un cultivo bacteriano de 500 mL.

Por último, antes de dar por definitivamente buena la construcción, se secuencian los extremos del inserto según se explica en el apartado 2.1.7. En este caso, se utiliza el cebador T7 (5'-taatacgaactcactataggg-3').

3.2.4.- Transfección estable del clon B2 con ADAMTS1 antisentido

3.2.4.1.- Condiciones de cultivo.

Ver apartado 2.1.2.

3.2.4.2.- Condiciones de la transfección

Las células B2 se transfectan con la construcción ADAMTS1-pZeoSV2(+), que origina RNA antisentido de ADAMTS1.

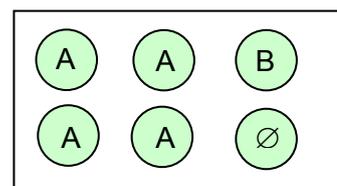
Las células de cada uno de los clones que se desea transfectar se siembran en sendas placas de 6 pocillos (de 35mm), utilizando inóculos de 200000 células por pocillo. Se dejan 2-3 horas en reposo en la estufa de cultivos (37 °C, en atmósfera húmeda de 5% CO₂)

para que se peguen al fondo de las placas, y a continuación se procede a la transfección, según el esquema de la figura.

En A se añade la construcción ADAMTS1-pZeoSV2(+)

En B se añade el plásmido pZeoSV2(+): es un control negativo de la transfección.

En \emptyset solo se añade medio de cultivo: permite controlar la acción de la zeocina



Por cada pocillo, se utilizan 2 μ g de la construcción plasmídica.

En un tubo eppendorf se ponen:

2 μ g de la construcción plasmídica	x μ L
Medio Optimem	(100-x) μ L

Se mezcla bien y se centrifuga ligeramente.

Se añaden 10 μ L del reactivo de transfección SuperFect (QIAGEN), que es un dendrímero activado que organiza el DNA en estructuras compactas para optimizar su entrada en el interior de las células. Se mezcla con la punta de pipeta y se deja incubando a temperatura ambiente durante 5-10 minutos

Mientras se forman los complejos DNA-SuperFect, se lavan los pocillos con PBS y se añaden a cada uno 600 μ L de medio (DMEM/HAMS F12) con suero fetal bovino al 10%.

Se añaden 100 μ L de los complejos DNA-SuperFect a cada pocillo y se incuba 2,5 horas en la estufa a 37 $^{\circ}$ C y 5% de CO₂.

Se elimina el medio y se lavan los pocillos 3-4 veces con PBS. Se añaden 3 mL medio (DMEM/HAMS F12) con suero fetal bovino al 10%. Se deja incubando en la estufa de cultivos toda la noche.

Al día siguiente, se elimina el medio de cultivo, se lavan los pocillos con PBS y se añade el medio de selección, que contiene zeocina (100 μ g/mL). La incubación debe hacerse en la oscuridad ya que la zeocina se degrada con la luz.

En días posteriores, las células a las que no se haya incorporado el plásmido habrán muerto (pocillo \emptyset). Las que presenten resistencia, formarán colonias, que se seleccionan y se cultivan individualmente en las mismas condiciones hasta poder conservarlas para probar si la incorporación de las construcciones es efectiva.

3.2.4.3.- Comprobación del éxito de la transfección

Para comprobar que la transfección ha sido efectiva, se obtiene DNA de los clones celulares seleccionados por su resistencia a la zeocina, se somete el DNA a una PCR en que se amplifica con cebadores específicos de ADAMTS1 y, por último, en los casos en que la PCR confirma la presencia de DNA de ADAMTS1, se realiza una prueba Southern para valorar la cantidad y la situación de este DNA.

3.2.4.3.1.- Obtención de DNA de los clones transfectados

En una placa de cultivos de 10 cm con unas $5 \cdot 10^6$ células, se añade 1 mL de tampón SET (SDS 10%(p/v) / EDTA 50 mM/ Tris-HCl 0,1M, pH 7,8) y se rascan las células del fondo de la placa. Se recoge todo en un tubo y se añaden 20 μ L de proteinasa K (10 g/L) por cada mL de suspensión celular. Se agita y se deja toda la noche a 37 °C (o bien 2-3 horas a 55-60 °C). Por último, se añaden 5 μ L de RNAsa A (10 g/L) por cada mL de solución de lisis. La RNAsa tiene que haberse hervido previamente durante 10 minutos.

A la solución de lisis se le añaden 20 μ L de NaCl 5M por cada mL, 0,5 volúmenes de fenol saturado con agua y 0,5 volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico (29:1). Se agita enérgicamente y se centrifuga a 2000g 20 minutos. Se recupera la fase superior y se añade 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (29:1). Se agita y se centrifuga a 2000g 20 minutos. Se recupera de nuevo la fase superior y se añaden 2 volúmenes de etanol. Se agita vigorosamente hasta que aparece la medusa de DNA y se deja toda la noche a -20 °C. Al día siguiente se centrifuga a 2000g 25 minutos a 4 °C. Se elimina el sobrenadante y se deja secar el tubo. Finalmente, el pellet se resuspende en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH7,4 / EDTA 1mM) y se mide la concentración en el espectrómetro.

3.2.4.3.2.- PCR de comprobación

Se hace la misma PCR que en el apartado 3.2.1, utilizando como muestra 5 μ L de una dilución 1/100 de los DNAs, y como cebadores para la amplificación [1330]: 5'-acgaggagcagaaggacca-3' y [1773]: 5'-ccccgtgtccattatctagga-3'.

Como el inserto era de cDNA, en los clones en que haya habido una transfección efectiva se deben obtener dos fragmentos distintos como productos de la PCR: uno de 444 pb (producido a partir del DNA exógeno) y otro de 1176 pb (producido a partir del DNA genómico).

3.2.4.3.3.- Prueba Southern de comprobación

Preparación de las membranas

En primer lugar, se digieren 10 μ g de cada uno de los DNAs con las enzimas de restricción Xba I y Eco RI (Roche), según la siguiente mezcla de reacción:

Tampón H (10X)	8 μ L
BSA 10X	8 μ L
Espermidina (0,1 M)	3,2 μ L
Xba I (10 U/ μ L)	4 μ L
Eco RI (10 U/ μ L)	4 μ L
H ₂ O	X = 80 – Y – 27,2 μ L
DNA (10 μ g)	Y μ L

dejando incubar toda la noche a 37 °C.

Los productos de la digestión se separan electroforéticamente en un gel de agarosa (0,8%)/TBE. Una vez suficientemente separados, el gel se tiñe en una solución de bromuro de etidio (1mg/L). Por último, se toma una fotografía del gel (graduada con una regla, para tener una escala con que poder medir la posición de la señal en la membrana tras la hibridación).

El gel se baña, a continuación, en una solución desnaturalizante de DNA (NaCl 1,5 mol/L y NaOH 0,5 mol/L) durante 30 minutos, y luego otros 30 minutos en una solución neutralizante (NaCl 1,5 mol/L y Tris-HCl (pH 8,0) 0,5 mol/L), antes de proceder a la transferencia estándar, por capilaridad, a membranas Hybond-XL de AmershamPharmacia, utilizando como tampón de transferencia una solución de SSC 10X.

Tras al menos 16 horas de transferencia, se fija el DNA a la membrana por iluminación con luz UV durante 1,5 minutos.

Obtención de sondas y marcaje radiactivo

En primer lugar, se marca radiactivamente la sonda que se va a utilizar: es el cDNA completo de ADAMTS1, obtenido por digestión del plásmido ADAMTS1-pZeoSV2(+) con Xba I y purificado mediante columnas de filtro GFX.

El marcaje se lleva a cabo con el equipo Ready-to-go (Pharmacia): se prepara la mezcla siguiente en un tubo eppendorf:

ADAMTS1 (digerido)	6 µL
H ₂ O	39 µL

Se hierve durante 3 minutos y se coloca 2 minutos en hielo. A continuación, se centrifuga y se transfiere al tubo en que se encuentra una bolita que contiene dNTPs, el fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I y oligodesoxirribonucleótidos aleatorios (principalmente de 9 nucleótidos). Se añaden 5 µL de [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol) y se incuba durante 20 minutos a 37 °C.

Transcurrida la incubación, y para eliminar los nucleótidos marcados radiactivamente que no se han incorporado a las cadenas de DNA sintetizadas en la reacción, se hace pasar la mezcla final por filtros en columna Quick Spin™ (Boehringer Mannheim), que solo dejan pasar los fragmentos más grandes de DNA (marcados o sin marcar), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Del filtrado final, se toman 2 µL para medir la radiactividad que tienen, de manera que se puedan añadir en la posterior hibridación fragmentos con un número conocido de cuentas por minuto (CPM).

Condiciones de la hibridación y lavados

Las membranas, humedecidas, se introducen en tubos de hibridación, se adhieren a sus paredes con el DNA hacia la luz del tubo, y se dejan en un horno de hibridación durante 30 minutos a 65 °C en el tampón de hibridación: tampón fosfato (pH 7,2) 0,5M, SDS 7%, EDTA 10mM.

A esta solución, se añade DNA de esperma de salmón con una concentración final de 0,1 g/L, previamente hervido para desnaturalizarlo.

A continuación, se vacían los tubos y se añaden de 30 a 70 µL de solución de hibridación fresca, a la que se incorpora de nuevo DNA de esperma de salmón (0,1 g/L) desnaturalizado, y por último se añade la sonda marcada radiactivamente, en cantidad suficiente para que haya unas 10⁶ CPM por mL de solución de hibridación.

Se continúa la incubación a 65 °C durante 2 horas.

Se sacan las membranas de los tubos y se hacen los siguientes lavados:

Dos lavados de 5 minutos a 65 °C, con una solución de SSC 2X y SDS 0,1% (p/v).

Dos lavados de 10 minutos a 65 °C, con una solución de SSC 1X y SDS 0,1% (p/v).

Hasta cuatro lavados de 5 minutos a 65 °C, con una solución de SSC 0,1X y SDS 0,1% (p/v)

Por último, la membrana se envuelve en plástico y se expone a una película Hyperfilm™ (Amersham) dentro de un casete con pantallas intensificadoras de la señal a – 80 °C, por tiempo variable, según la radiactividad que se detecta en la membrana con un contador *geiger*.

3.2.5.- Valoración de la expresión de ADAMTS1 en los clones transfectados seleccionados

Una vez demostrada la presencia del DNA exógeno en los clones, se valora la expresión de ADAMTS1 en ellos, que será la suma de la debida a las propias células y la debida a la construcción plasmídica introducida. Esta comprobación se realiza mediante una prueba Northern.

3.2.5.1- Obtención de RNA (total)

Se cultivan los clones seleccionados tras la prueba Southern en las condiciones detalladas en el apartado 2.1.2 (hasta unas 5·10⁶ células.)

Se añade a la placa de cultivos 7,5 mL de una solución de lisis (tiocianato de guanidinio 4M, citrato sódico 25 mM, sarcosil 0,5%, 2-mercaptoetanol 0,1M), se rascan las células y se recogen en un par de tubos. Las células lisadas se homogeneizan aspirando y expulsando varias veces con una jeringa.

A cada solución homogeneizada se le añade, secuencialmente,
0,1 volumen de acetato sódico 2M (pH 4),

1 volumen de fenol saturado con agua (pH 4,5) y
0,2 volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1).

Se agita bien la suspensión y se deja en hielo 15 min. Se centrifuga a 10000g durante 20 min (a 4 °C). A continuación, se transfiere la fase acuosa a un tubo limpio y se mezcla con 1 volumen de isopropanol. Se deja así toda la noche a -20 °C, y al día siguiente se centrifuga a 10000g durante 20 min (a 4 °C). Se elimina el sobrenadante, y el pellet se disuelve en 0,3 volúmenes de la solución de lisis. Se añaden 2 volúmenes de etanol absoluto y se deja toda la noche a -20 °C. Al día siguiente, se centrifuga a 10000g durante 10 min (a 4 °C). Se elimina el sobrenadante. El pellet se lava con etanol al 75% frío, y se centrifuga a 10000g durante 10 min (a 4 °C). Por último, se elimina el etanol y se deja secar el pellet dejando el tubo en hielo.

El RNA se resuspende en agua tratada con DEPC (libre de RNAsas) y se mide su concentración en un espectrómetro. Para conservarlo, se mantiene a -80 °C.

3.2.5.2.- Obtención de RNA poliA a partir de RNA total.

Se parte de 100 µg de RNA de cada clon, y se utiliza el equipo Oligotex™ Direct mRNA (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.5.3.- Hibridación Northern

Se siguen los mismos pasos que se explican en el apartado 2.1.9, con las siguientes salvedades:

La cantidad de mRNA que se utiliza por membrana es de unos 15 µg

El marcaje radiactivo se realiza según lo explicado en el apartado 5.2.4.3.3.

3.2.6.- Efecto de la expresión de ADAMTS1 sobre la adhesión *in vitro* de las células al sustrato

En el presente trabajo, se ha analizado el efecto de los niveles de expresión de ADAMTS1 sobre: a) la adhesión de las células a los distintos sustratos (componentes de la matriz extracelular), y b) sobre la capacidad migratoria *in vitro*. Para ello se han utilizado las células B2, con mayor expresión basal de ADAMTS1 (9 veces superior, como se indica en la figura 3.1) tras la transfección estable con el vector pZeo-SV2 conteniendo o no el cDNA completo de ADAMTS1 en antisentido (B2 antiADAMTS1).

Para determinar la capacidad de adhesión de ambas líneas celulares (tanto las transfectadas como las no transfectadas), a diferentes macromoléculas presentes en la matriz extracelular (o análogos sintéticos), las células, previamente marcadas radiactivamente con ⁵¹Cr, se inocularon sobre superficies de plástico directamente o bien recubiertas con dichas macromoléculas (gelatina, Matrigel™, laminina 1, colágeno tipos I y IV, fibronectina y vitronectina), y, tras una incubación, se sometieron a un lavado suave,

idéntico en todos los casos, para eliminar aquellas que no se habían adherido al sustrato. Tras la lisis de las células adheridas, se cuantificó la radiactividad y los resultados de la adhesión sobre cada sustrato pueden ser expresados en relación a los obtenidos sobre el plástico.

Preparación de los sustratos. La gelatina se preparó al 2% (peso/volumen, con agua bidestilada). El Matrigel™ (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA, USA) se diluyó en una proporción 1:10 con medio sin suero. Las proteínas de la matriz extracelular: laminina 1, colágeno tipos I y IV, fibronectina y vitronectina se prepararon a una concentración de 10 µg/mL (con agua bidestilada). De cada una de las distintas soluciones preparadas, se añadieron 50 µL por pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (Tecno Plastic Products, TPP, Suiza). Posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron suavemente una vez con PBS (sin Ca²⁺ y sin Mg²⁺), y las superficies que hubieran podido quedar sin cubrir se bloquearon a continuación con 100 µL de una solución salina con 0,2% (peso/volumen, con agua bidestilada) de BSA (Sigma Chemical Co) mediante incubación de una hora a 37 °C. Después, la solución se eliminó mediante aspiración, y los pocillos quedaron así preparados para inocular las células en los experimentos de adhesión.

Marcaje celular con ⁵¹Cr. Las células procedentes de cultivos en fase exponencial de crecimiento en DMEM (**D**ulbecco's **M**odified **E**agle **M**edium) y en medio Ham (en proporción 1:1) (Life Technologies, UK), suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado (Biological Industries, Israel), L-glutamina 2mM y piruvato sódico 1 mM (Life Technologies, UK), se separaron del frasco de cultivo con tripsina al 0,25% (peso/volumen) y EDTA 0,02 mM (Life Technologies, UK). Tras centrifugación (1000 rpm durante 10 min a 4°C) las células del pellet se resuspendieron en 10 mL de medio sin suero que contenía un 0.2% (peso/volumen) de BSA. Un total de 4x10⁶ células en 0,8 mL de medio con BSA se incubaron con 0,2 mL de ⁵¹Cr (400 µCi de una sal sódica de ⁵¹Cr, Amersham Life Science, UK) durante 2 h a temperatura ambiente en un agitador orbital, permitiendo así la difusión pasiva del cromato sódico al interior de la célula. Las células marcadas radiactivamente se recogieron y lavaron dos veces por centrifugación con medio sin suero que contenía BSA, y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente para eliminar el ⁵¹Cr no incorporado. Por último, se preparó una suspensión de 1x10⁶ células/mL en medio sin suero con BSA a partir de la cual se inocularon por sextuplicado 100 µl en los pocillos preparados con los distintos sustratos. La actividad específica de las células marcadas variaba entre 0,5 y 1 cpm/célula.

Ensayos de adhesión. Las incubaciones de las células sobre los sustratos se realizaron a 37°C en atmósfera saturada de humedad y un flujo de 5% de CO₂ en aire, durante 6 horas. Transcurrido este periodo, el sobrenadante de los pocillos de placas de 96

fue retirado por aspiración y estos fueron lavados dos veces mediante adición y aspiración de 200 μ L de medio con BSA, eliminando las células no adheridas al sustrato.

La medición de la radiactividad de las células adheridas se realizó en un contador de centelleo (LKB gamma spectrometer, Wallac, Finlandia), tras lisarlas con 100 μ L por pocillo de PBS con 0,2% de Triton X 100 (Sigma).

3.2.7.- Efecto de la expresión de ADAMTS1 sobre la capacidad migratoria *in vitro*.

La capacidad de migración de las células en estudio se determinó midiendo el porcentaje de células de una cantidad inicial dada que son capaces de atravesar una barrera (filtro) que contiene componentes de la matriz extracelular (colágeno), montado sobre cámaras bicompartimentales de Boyden (figura 3.2), en un tiempo fijado previamente. Estos experimentos de movilidad de las células permiten la valoración cuantitativa de la capacidad invasiva de las células tumorales.

Se utilizaron filtros de policarbonato para “*transwell*” de 8 μ m de diámetro de poro (Costar). Cada filtro se dejó en contacto durante toda una noche con 5 μ g de colágeno tipo IV (Sigma Chemical Co o Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA, USA). Para los lavados y el bloqueo de los radicales de unión que quedaban sin unir en los filtros o en los pocillos se utilizó medio con BSA al 0,1%.

La cámara inferior se rellenó con medio condicionado de fibroblastos NIH3T3 para que aportara quimioatrayentes. Este medio se obtuvo mediante incubación de las células en medio sin suero hasta que alcanzaban la semiconfluencia (48 h a 37 °C)

Las suspensiones de células sin transfectar (B2) o transfectadas (B2-antiADAMTS1) se obtuvieron mediante tripsinización de cultivos que se encontraban en crecimiento exponencial; posteriormente se lavaron dos veces antes de ponerlas a incubar durante 4 h en un medio sin suero. Luego, las células se lavaron y se resuspendieron en medio fresco, se depositaron 2×10^5 células encima del filtro de la cámara superior y se incubaron durante

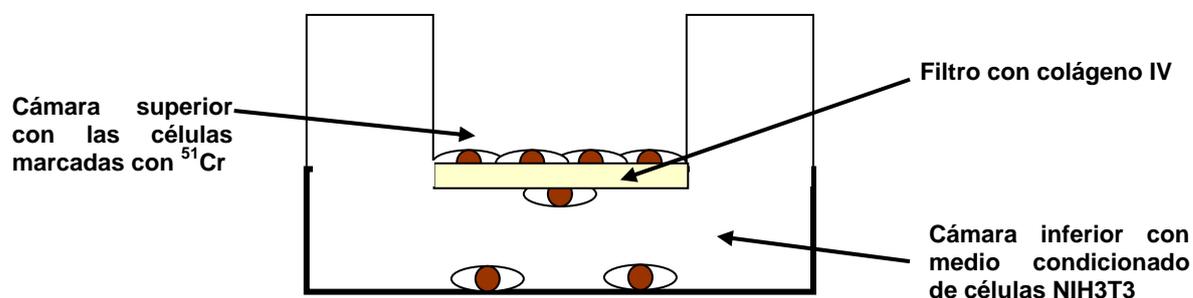


Figura 3.2.- Cámara de Boyden para la realización de experimentos de migración *in vitro*. En el compartimiento superior, en cuya base hay un filtro de policarbonato recubierto de colágeno IV, se depositan células en cultivo, marcadas con ^{51}Cr . Las células que pueden migrar a través del filtro recubierto se recogen en la cámara inferior (tanto procedentes de la base como de la parte interna del filtro). La proporción de radiactividad medida en el medio con células recogido de esta cámara es reflejo de la proporción de células con capacidad de migración a través del filtro.

6 h a 37 °C en un incubador con un 10% de CO₂. Las células que habían pasado al compartimiento inferior y las que se habían quedado adheridas a la superficie inferior del filtro, se recogieron mediante tratamiento con tripsina al 0,25% y se contaron al microscopio en una cámara de Neubauer (para que el recuento sea fiable, deben contarse al menos 33 células usando el número necesario de campos).

Todas las medidas se realizaron por sextuplicado.

3.2.8.- Efecto de la expresión de ADAMTS1 sobre la capacidad tumorigénica y metastásica *in vivo*.

Animales de experimentación

Para los ensayos de tumorigenicidad y metástasis se utilizaron ratones hembras vírgenes de la cepa B6D2 F1 (híbridos de primera generación de los cruces C57Bl6 x DBA/2) de entre 8 y 10 semanas de edad, suministrados por CRIFFA (Áreas de Producción Animal IFFA-CREDO Inc., Lyon, Francia).

Los ratones se alojaron en jaulas de Makrolon® (220cm x 220 cm x 145 cm) colocadas en estanterías. Las jaulas dispusieron de viruta en el suelo. El cuidado de los animales se realizó de acuerdo con los Procedimientos de Trabajo del Establecimiento Usuario (Institut de Recerca Oncològica), registrado con el N° B-990010 (Departament d'Agricultura Ramaderia i Pesca, Generalitat de Catalunya), siguiendo los criterios establecidos en el anexo II de la Directiva del Consejo 86/609/CEE y el Real Decreto 233/1988. Brevemente, la temperatura del estabulario se mantuvo a 22±2 °C, y la humedad relativa entre el 50% y el 70% aproximadamente. La iluminación estuvo controlada para proporcionar 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad cada 24 horas.

Todos los ratones se sometieron a un periodo de aclimatación de una semana transcurrida entre la fecha de llegada y el inicio de los experimentos.

En el transcurso de los experimentos, los animales tuvieron libre acceso a una dieta controlada para ratones suministrada y certificada por Panlab SA (Barcelona) y dispusieron de agua *ad libitum*. El agua fue periódicamente analizada para la detección de posibles contaminantes y para el contenido iónico y pH.

Diseño experimental

Todos los animales fueron anestesiados e inoculados en la mama anteposterior izquierda con 5x10⁵ células viables de MXT-B2 o transfectantes estables de ADAMTS1 (procedentes de cultivos exponenciales), en un volumen de 100 µl en medio de cultivo. Las células se tripsinizaron, se lavaron con medio de cultivo sin suero bovino fetal y se resuspendieron en el mismo medio a una densidad de 5x10⁶ células. Los contajes de las células fueron realizados por cuadruplicado a partir de la suspensión celular de cultivo y

valorada su viabilidad mediante tinción con azul tripano. Antes de los experimentos, se comprobó que las células estaban libres de Mycoplasma.

Tras la inoculación, se observaron los ratones hasta detectar la aparición de tumores, considerándose como tiempo de latencia el tiempo que tardaron en desarrollar un tumor detectable de 10mm de diámetro máximo. Los volúmenes tumorales fueron calculados mediante la fórmula: $[\text{volumen}(\text{mm}^3) = \frac{1}{2} x^2 y]$, siendo x e y los diámetros axial y sagital, respectivamente.

Cuando los tumores alcanzaron un volumen de 1cm^3 , fueron extirpados quirúrgicamente utilizando anestesia. Tras la intervención y recuperación post-anestesia, los animales fueron mantenidos vivos en las mismas condiciones de estabulación descritas previamente. Los ratones se sacrificaron por eutanasia activa transcurridos 90 días después de la extirpación del tumor. En la necropsia de los animales se investigó la presencia de masa tumoral en todos los órganos viscerales, siguiendo criterios morfológicos e histológicos. Los pulmones se separaron, se lavaron en solución salina y se fijaron para su estudio morfológico dirigido a la detección de posibles metástasis.

3.3.- RESULTADOS

3.3.1.- Obtención del cDNA completo de ADAMTS1

Tras el primer cribado de la genoteca S15, se obtuvo un fásmido cuyo inserto contenía una buena parte del cDNA de ADAMTS1, en concreto desde la posición 999 de la secuencia del GenBank D67076 (correspondiente al mRNA de ADAMTS1). El extremo 3' no presentaba homología con esta secuencia, pero sí con la del gen (AB001735). Como la genoteca empleada para el cribado es de cDNA, se puede concluir que la secuencia insertada en el fásmido procede de mRNA, pero es más larga que la publicada en el GenBank (**Figura 3.2**).

Sin embargo, para poder llevar a cabo el estudio de transfecciones estables en sentido y antisentido era conveniente disponer de la secuencia completa del cDNA, especialmente porque en el cDNA insertado en el fásmido faltaba todo el principio (primer exón). Por ello, se procedió a cribar la genoteca S15 con sondas específicas de ADAMTS1.

```
1 gcagctccga gctaggtgct atcgcaaggc cagagcgcac agcccggcgg agagagcaga
61 tccttgctca gatcgagtca aatcgggcca aggcggagga cgaagagtcc aggctcctat
121 tctggacttg ttccccagct ccgggggvcg ttctaggtcc tgcagcagcc agcagtgcgg
181 agccaccaac tcggtgctgg aatgaaaaaa ttccgcgcg ccagtgcaga atctttctaa
241 gtgacccgga gcttcgggtg ctagctctgc acgaactttc ccatcaaagt gatcgtgaat
301 tttaaagcatc aggagcaggc cagcgaagct ctacgcgtct aaacgtctat ccagaccaag
361 agttctctgc ggtgcagggt gcggtgccat gcagccaaaa gtcccttttg gggtcacgca
421 agcagaagcc ctgctccgac atgggggacg tccagcgggc acgcgagatct cggggctctc
481 tgtccgcada catgctgttg ctgctcctcg cttccataac aatgctgcta tgtgcgcggg
541 gcgcacacgg gcgccccacg gaggaagatg aggagctggt cctgccctcg ctggagcgcg
601 ccccggggcca cgattccacc acca cacgcc ttcgtctgga cgcctttggc cagcagctac
661 atctgaagtt gcagccggac agcggtttct tggcgcctgg cttcacctcg cagactgtgg
721 ggcgcagtc ccgggtccgag gcacaacatc tggacccac cggggacctg gctcactgct
781 tctactctgg cacgggtgaac ggtgatcccg gctctgcccg agccctcagc ctctgtgaag
841 gtgtgcgtgg tgccttctac ctacaaggag aggagtctct cattcagcca gcgcctggag
901 tggccaccga gcgcctggcc cctgccgtgc ccgaggagga gtcatccgca cggccgcagt
961 tccacatcct gaggcgaagg cggcggggca gtggcggcgc caagtgcggc gtcattggag
1021 acgagaccct gccaaccagc gactcgcgac ccgagagcca gaacaccgg aaccatggc
1081 ctgtgcggga ccccacgcct caggacgcgg gaaagccatc aggaccagga agcataagga
1141 agaagcagatt tgtgtccagc ccccgttatg tggaaacat gctcgtagct gaccagtcca
1201 tggccgactt ccacggcagc ggtctaaagc attaccttct aacctgttc tcggtggcag
1261 ccaggtttta caagcatccc agcattagga attcaattag cctgggtggg gtgaagatct
1321 tggatcatata cgaggagcag aagggacca agttacctc caatgcagct ctcaccctc
1381 ggaatctctg cagctggcag aaacaacaca acagccccag tgaccgggat ccagagcact
1441 atgacactgc aattctgttc accagacagg atttatgtgg ctcccacacg tgtgacactc
1501 tcggaatggc agatgttggg accgtatgtg accccagcag gagctgctca gtcatagaag
1561 atgatggttt gcaagccgcc ttcaccacag ccatgaatt gggccatgtg tttacatgc
1621 cgcacgatga tgctaagcac tgtgccagct tgaatggtg gatggcgat tctcatctga
1681 tggcctcgat gctctccagc ttagaccata gccagccctg gtcaccttgc agtgcctaca
1741 tggtcacgct ctccctagat aatggacacg gggaatgttt gatggacaag cccagaatc
1801 caatcaagct cccttctgat cttcccggta ccttgtaaga tgccaaccgc cagtgtcagt
1861 ttacattcgg agaggaatcc aagcactgcc ctgatgcagc cagcacatgt actaccctgt
1921 ggtgcactgg cacctccggt ggcttactgg tgtgccaac aaaacacttc cctggggcag
1981 atggcaccag ctgtggagaa gggaggtggt gtgtcagtg caagtgcgtg aacaagacag
2041 acatgaagca ttttgcta ctctgttcag gaagctgggg accatgggga ccgtggggag
2101 actgctcaag aacctgtggt ggtgagttc aatacacaat gagagaatg gacaaccag
2161 tcccaaagaa cggaggggag tactgtgaag gcaaacgag cgcctacag tctgttaaca
2221 tcgaggactg tccagacaat aacgtaaaaa cgttcagaga ggagcagtc gagggcaca
2281 atgagttttc caaagcttcc tttgggaatg agcccactgt agagtggaca ccaagtagc
```

```

2341 ccggcgtctc gccaaaggac aggtgcaagc tcacctgtga agccaaaggc attggctact
2401 ttttcgtctt acagcccaag gttgtagatg gcactccctg tagtccagac tctacctctg
2461 tctgtgtgca agggcagtggt gtgaaagctg gctgtgatcg catcatagac tccaaaaaga
2521 agtttgataa gtgtggcggt tgtggaggaa acggttccac atgcaagaag atgtcaggaa
2581 tagtcactag tacaagacct gggatatcat acattgtcac aattcctgct ggagccacca
2641 acattgaagt gaaacatcgg aatcaaaggg ggtccagaaa caatggcagc tttctggcta
2701 ttagagccgc tgatggtacc tatattctga atggaaactt cactctgtcc acactagagc
2761 aagacctcac ctacaaaggt actgtcttaa ggtacagtgg tcctcggct gcgctggaaa
2821 gaatccgcag ctttagtcca ctcaaagaac ccttaacat ccaggttctt atggtaggcc
2881 atgctctccg acccaaaatt aaattcacct actttatgaa gaagaagaca gagtcattca
2941 acgccattcc caca ttttct gagtgggtga ttgaagagt gggggagtgc tccaagacat
3001 gcggtcaggg ttggcagaga agagttagtg agtgcagaga cattaacgga cacctgctt
3061 ccgaatgtgc aaaggaagtg aagccagcca gtaccagacc ttgtgcagac cttccttgcc
3121 cacactggca ggtgggggat tggtcacat gttccaaaac ttgctgggaag ggttacaaga
3181 agagaacctt gaaatgtgtg tcccacgatg ggggcgtggt atcaaatgag agctgtgatc
3241 ctttgaagaa gccaaagcat tacattgact ttgcacact gacacagtgc agttaagagg
3301 cgtagagga caaggtagcg tggggagggg ctgatacact gagtgcaga gtactggagg
3361 gatccagtgta gtcaaaccag taagcagtga ggtgtggcaa ggaggtgtgt gtaggggata
3421 catagcaaag gaggtagatc aggacactac cctgccagtt acattctgat aaggtagtta
3481 atgaggcaca gtagcatctg aaagaccata cagagcacta aggagcccca aagcactatt
3541 agtatctctt ttcttatatc tatcgcccaa ataattttca gagtctggca gaagccctgt
3601 tgcactgtac taactagata cttcttatca caaagattgg gaaaggcaaa gcagaaagat
3661 ggtaagactg ggtttcaaac aaggcttggg ttcaatcact ggaggcaagg aggaggggac
3721 aaacaagatc attattcgaa gtcgctggtt gctgtggtt tacggaaggt tgatgcatca
3781 ttctatcaa cagtgaaaag ttcagcttgt tcaacgtgac agaaaggctc atctccgtga
3841 aagagctcct gatttcttct tacaccaatct cagttcttaa ctatagttca tgttaggta
3901 gaaacaattc atctatttat aaaatgtaca ttggaaaaaa aaagtgaagt ttataggta
3961 cacataaaaa ctgaaggaaa caatgagcaa catgcctcct gctttgcttc ctctgaggt
4021 aaacctgcct ggggattgag gttgtttaag attatccatg gctcacaaga ggcagtaaaa
4081 taatacatgt tgtgccagag ttagaatggg gtatagagat cagggtccca tgagatgggg
4141 aacatggtga tcaactcatc cacatgggag gctgctgcag gtagcaggt ccaactctgg
4201 cagctgggtcc aacagtcgta tcttgggtgaa tgtctgttca gctcttctac tgagagagaa
4261 tatgactggt tccatagta tatgtatata gtaaaatag ttactatgaa ttgcatgtac
4321 tttataagta ttggtgtgct tgttccttct aagaaggact atagttata ataaatgcct
4381 ataataacat atttatTTTT atacatttat ttctaagat aaaaccttta agttatatcg
4441 cttttgtaaa agtgcataata aaaatagagt atttatacaa tatatgttaa ctagaaataa
4501 taaaagaaca cttttg

```

Figura 3.2.- Secuencia del cDNA de ADAMTS1 (GenBank : D67076). En colores (verde: dirección 5', y amarillo: dirección 3'), se señalan las secuencias de los cebadores que se han empleado en el presente trabajo, tanto en la secuenciación como en la comprobación por PCR de la existencia de inserto en los diferentes vectores plasmídicos empleados. Los números con que se nombra en el texto a los cebadores corresponden a la posición en esta secuencia.

La secuencia del inserto obtenido tras el cribado de la genoteca S15 es la misma, menos los 22 primeros nucleótidos, que le faltan (señalado en azul), y el añadido de un fragmento extra (en la zona 5') de 336 nucleótidos, que se señala en rojo.

El codón inicial de la proteína (atg) está señalado en la posición 441.

3.3.1.1.- Cribado de la genoteca S15 con sondas ADAMTS1

La genoteca de cDNA se hibridó primero con una sonda que abarcaba desde la posición 1003 a la 3326 de ADAMTS1, y se obtuvo un resultado como el de la **figura 3.3**, en que se observan las señales originadas por virus con inserto de ADAMTS1 en un par de membranas.

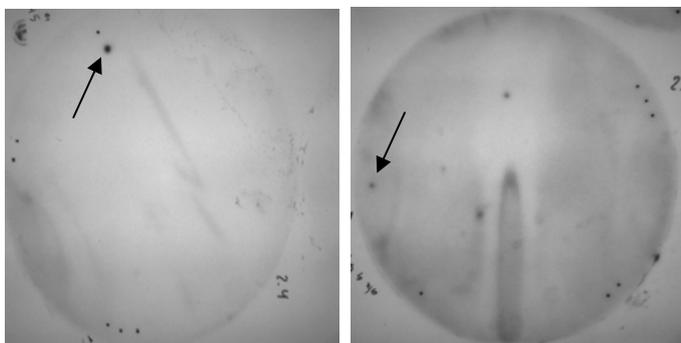
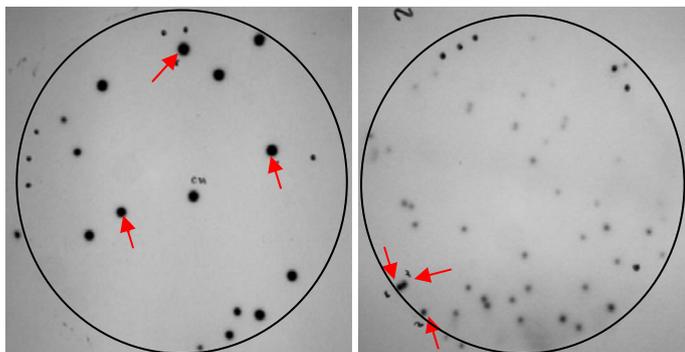


Figura 3.3.- Cribado de la genoteca S15 con la sonda ADAMTS1 (1003-3326). Se muestran dos imágenes de membranas distintas (la 4 y la 6) en que las flechas señalan las calvas que se han seleccionado. La zona en que se encuentran las calvas positivas se recortan para realizar una nueva hibridación

Los virus correspondientes no se podían aislar todavía debido a la gran densidad de calvas (hay unas 50000 representadas en cada una). Por tanto, se recortó de la placa de agar la zona de la señal y se prepararon más placas, en que ya las calvas quedaban bien separadas. Las membranas correspondientes se hibridaron con otra sonda de ADAMTS1 (entre las posiciones 1 y 1021). Al ser complementaria a la primera usada, los virus que hibriden deberían tener una gran probabilidad de presentar insertos muy completos, con un fragmento relativamente grande de la zona inicial del cDNA, que es lo que se pretende. Los

Figura 3.4.- Cribado de la genoteca S15 con la sonda ADAMTS1 (1-1021). Se muestran dos imágenes de membranas distintas (la 4.1 y la 6.1), dibujadas aproximadamente con sendos círculos, en que las flechas señalan algunas de las calvas seleccionadas. Los virus correspondientes se someten a PCR para determinar la longitud del inserto que contienen, y a posterior secuenciación, si el resultado de la PCR es satisfactorio.



resultados habidos en un par de membranas se muestran en la **figura 3.4** a modo de ejemplo. El número de calvas que hibridan es ahora relativamente pequeño, y debe haber aumentado la proporción de los que llevan un inserto mayor (en tamaño absoluto o, al menos, hacia el extremo 5' de ADAMTS1). Teóricamente, todos deberían proceder del mismo virus inicial, que originaba señal en la primera hibridación. Sin embargo, al haberse hecho la segunda con una sonda distinta, podría ocurrir que hubiera virus que al principio no hibridaran y después sí lo hicieran. Por eso se recortan diversas calvas para después poder seleccionar.

Del conjunto de virus aislados, se hacen PCRs con diversos cebadores de la zona 5' de ADAMTS1 para identificar aquellos que tienen el inserto lo más completo posible. Así, por ejemplo, cuando los virus recortados de las placas 4 y 6 de la **figura 3.3** se someten a PCR con las parejas de cebadores (DES-423—DES-1021) y (DES-521—DES-1021), se observan los resultados de la **figura 3.5a**: los dos virus (en realidad, mezcla de virus) recortados tras la primera hibridación contienen la zona 5', al menos, desde la posición 521, y probablemente sólo el procedente de 4 contiene también el cDNA desde 423 (aunque los productos de PCR obtenidos no son los esperados).

Con los virus de 4 y 6 se preparan nuevas placas (4.1 y 6.1) con calvas bien separadas. Tras la hibridación con las membranas correspondientes, se recortan varias calvas (las que se señalan con flechas rojas en la **figura 3.4**), y se someten los virus a una PCR con cebadores (M13r –DES1021) (**figura 3.5b**). M13 es un cebador que reconoce una zona del fásmid y, por tanto, externa al cDNA. Solamente los virus procedentes de la placa 4.1 dan origen a un producto del tamaño esperado (1125 pb). Por tanto, pueden descartarse los procedentes de la placa 6.1.

Los tres virus recortados de 4.1 se someten a una PCR en que se utilizan las parejas de cebadores (DES-1—DES-1021) y (DES-1003—DES-2934). Con ello se pretende tener un idea de si se contiene toda (o prácticamente toda) la secuencia de cDNA de ADAMTS1 que se traduce en proteína. El resultado se observa en la **figura 3.5c**: no se produce amplificación con la pareja que contiene la posición 1, pero sí con la que contiene la posición 2934, de donde puede deducirse que en el inserto del virus falta el inicio del primer exón. No obstante, como seguramente contiene la secuencia desde al menos 423, y la región que se traduce comienza en 441, es un buen candidato a priori para ser seleccionado. Por tanto, se procede a su secuenciación.

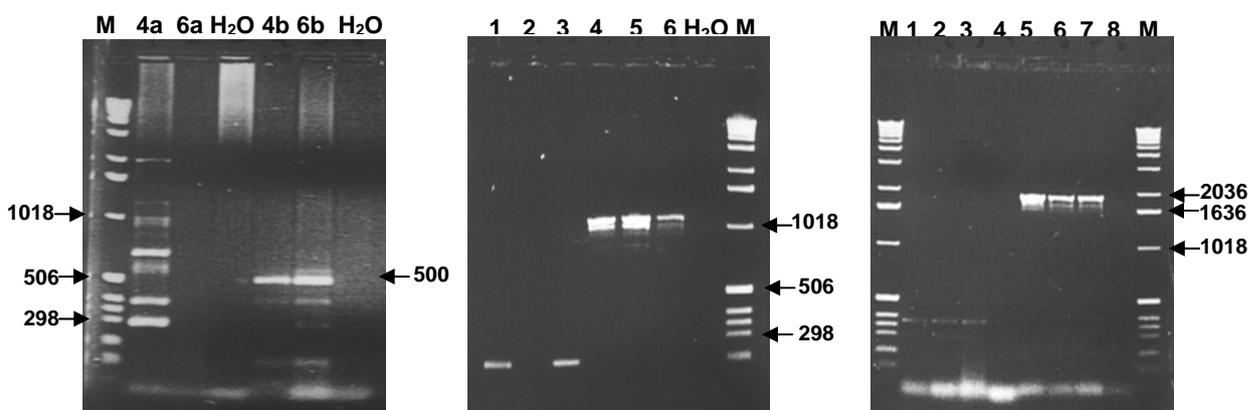


Figura 3.5.- PCRs para seleccionar virus con insertos de ADAMTS1 de la mayor longitud posible por el extremo 5' (ver texto). En todos los casos, M es el marcador 1kb ladder. **(a)** 4 y 6 corresponden a virus del primer cribado. Se esperaba un producto de 598 pb en los carriles 4a y 6a, y uno de 500 pb en los carriles 4b y 6b. **(b)** 1, 2 y 3 corresponden a los virus de la placa 6.1, y 4, 5 y 6, a los de la placa 4.1; en todos los casos, se espera un producto de 1125 pb. **(c)** Productos correspondientes a los virus recortados de 4.1; se esperaba un tamaño de 1021 pb para los carriles 1, 2 y 3; y un tamaño de 1931 pb para los carriles 5, 6 y 7 (4 y 8 corresponden a H₂O).

3.3.1.2- Secuenciación de los insertos seleccionados

Los virus que se habían seleccionado de la placa 4.1 se secuenciaron parcialmente por sus extremos, utilizando los cebadores M13f (para el extremo 3' del inserto) y M13r (para el extremo 5' del inserto). Como resultado, se observó que el cDNA de ADAMTS1 contenido en los tres virus comenzaba en la posición 22 de la secuencia del GenBank (D67076), lo cual explicaba la ausencia de producto de PCR observado en la **figura 3.5c**, ya que en la reacción se empleaba el cebador DES-1. Por otra parte, el extremo 3' del inserto contenía un fragmento de 346 pb extra con respecto a la secuencia D67076 (ver **figura 3.2**). Este fragmento está publicado en la secuencia del GenBank AB001735, que corresponde al gen de ADAMTS1, y se sitúa en la región 3'UTR (3'*untranslated region*), zona considerada dentro del último exón, pero no traducida a proteína.

Puesto que los tres virus resultaban tener una secuencia idéntica, se continuó la secuenciación con uno solo de ellos. En la **figura 3.6** se muestra el esquema de la situación de los distintos cebadores empleados en la secuenciación del inserto de ADAMTS1. La secuenciación se realizó gradualmente, diseñando nuevos cebadores a medida que se iban secuenciando nuevos fragmentos, y se observó que el resto del cDNA coincidía con el ya publicado.

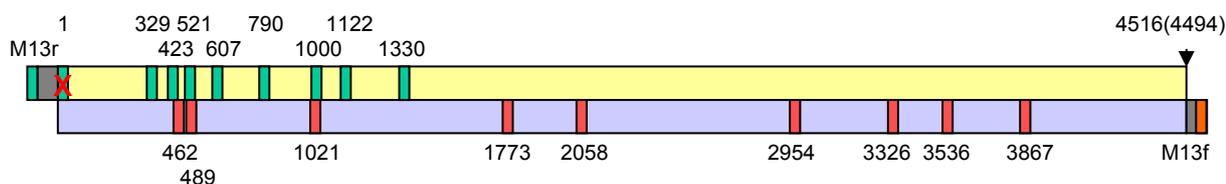


Figura 3.6.- Las dos cadenas del cDNA se muestran con distinto color. Los cebadores en sentido hacia 3' de ADAMTS1 están en color verde; los de sentido hacia 5' de ADAMTS1, en color naranja. El cebador DES-1 está tachado porque no existe en el inserto del virus. La posición final de la secuencia publicada es 4516, pero en el inserto, al faltar los primeros 22 nucleótidos, se convierte en la posición 4494.

3.3.2.- Transfección del cDNA de ADAMTS1 en células de distinta capacidad metastásica.

Tras secuenciar por completo el inserto de ADAMTS1, se disponía ya de información suficiente para comenzar el proceso de transfección de este cDNA en antisentido en clones celulares de elevada capacidad metastásica. Para facilitar la construcción en antisentido, se decidió transferir el inserto desde el fásmido a otro vector plasmídico.

3.3.2.1.- Preparación de la construcción en antisentido

El primer paso de la transferencia de cDNA de ADAMTS1 a otros vectores es digerir el fásmido con enzimas de restricción para separar sus dos componentes; pero como el inserto de ADAMTS1 tiene una longitud de 4494 pb, y el fásmido pBK-CMV en que está incluido tiene 4463 pb, si se hiciera una simple separación enzimática de los dos

componentes, no se podrían distinguir en un gel de electroforesis. Debido a esto, es necesario romper la mitad plasmídica en varios fragmentos perfectamente diferenciables por su tamaño del cDNA de ADAMTS1.

El vector pBK-CMV presenta 5 dianas para la enzima de restricción Bgl I, mientras que ADAMTS1 no presenta ninguna. Por otra parte, las enzimas Sal I y Not I tienen dianas únicas en la zona del poliligador del vector, por donde se ha insertado el cDNA de ADAMTS1. Al digerir con las tres enzimas, se producen los fragmentos que se muestran en la **figura 3.7a**, y al separarlos electroforéticamente se observa la imagen de la **figura 3.7b**.

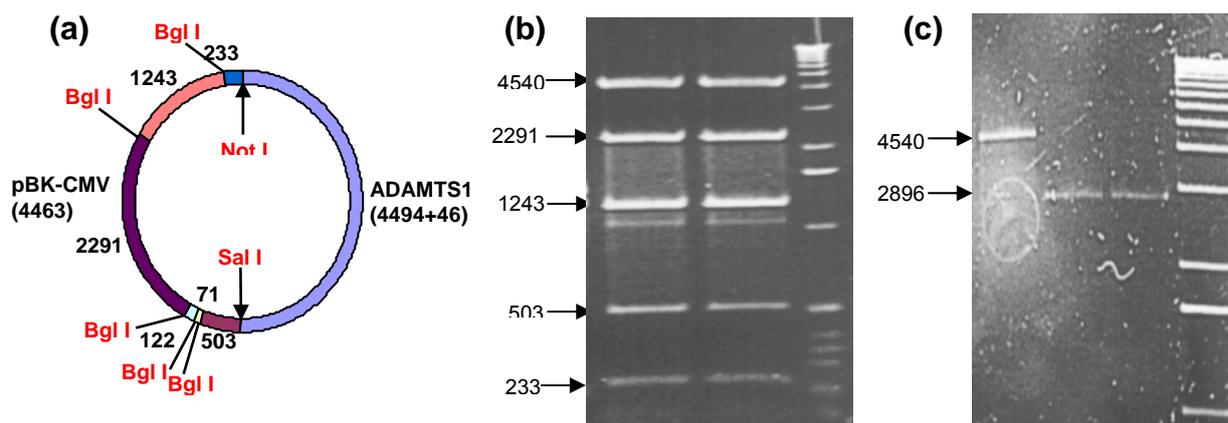


Figura 3.7.- Digestión del fásmido pBK-CMV-ADAMTS1 con las enzimas de restricción Sal I y Not I. (a) Esquema del fásmido con la indicación de los puntos de corte esperados. **(b)** Fotografía del gel de agarosa donde se han separado los productos de la digestión para comprobar que los fragmentos originados son los esperados (no se observan los dos más pequeños, de 122 y 71 pb). El fragmento de 4540 pb (suma de 4494 pb de ADAMTS1 y dos fragmentos de 26 y 20 pb del poliligador) se recorta del gel y se purifica para su ligación con el vector pCR-SK(-), linealizado por digestión con las mismas enzimas. En **(c)**, se observan los productos de digestión purificados: el de 2896 pb corresponde a pCR-SK(-) linealizado. En las dos electroforesis se ha usado, como marcador de tamaño, "Ladder" 1kb.

El fragmento de 4540 pb (ADAMTS1) se recorta del gel y se purifica. Por su parte, el vector pCR-SK(-), de 2896 pb, se linealiza mediante digestión con las enzimas Sal I y Not I. Los productos de la purificación de ADAMTS1 y la digestión de pCR-SK(-) se muestran en la **figura 3.7c**.

Tras ligar los productos de la **figura 3.7c** y transformar bacterias XL1-Blue con la construcción resultante, se seleccionan unas cuantas colonias que supuestamente la contienen, lo cual se comprueba mediante PCR (con los cebadores DES-1122—DES-2058). De algunas de las colonias se obtienen los plásmidos, y se vuelve a comprobar, esta vez mediante digestión con las enzimas Bam HI y Kpn I, que el inserto del plásmido es correcto (**figura 3.8**). Puesto que los fragmentos que se obtienen tras la digestión son del tamaño esperado, se acepta que el inserto es correcto, y se puede proceder al siguiente paso: transferir el cDNA de ADAMTS1 a los plásmidos pZeoSV2. Para ello, se digiere primero el

plásmido recién construido pCR-SK(-)—ADAMTS1 con las enzimas de restricción *Apa* I y *Not* I (**figura 3.9**), se separan electroforéticamente y se purifica el fragmento de cDNA.

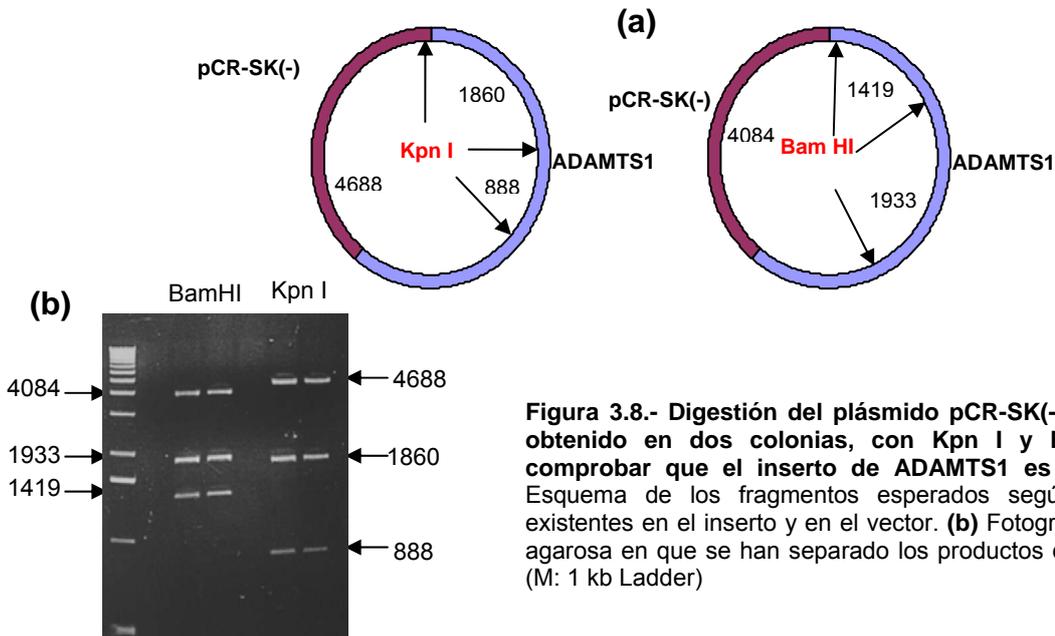
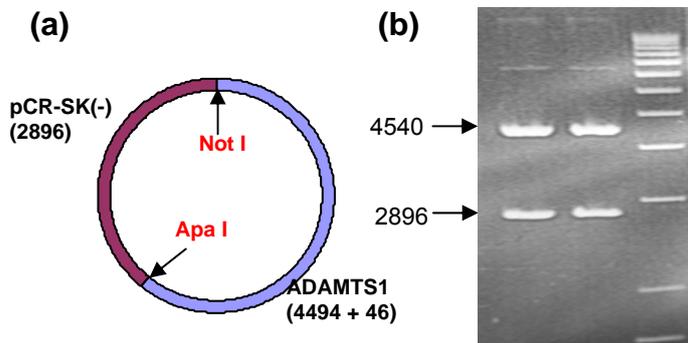


Figura 3.8.- Digestión del plásmido pCR-SK(-)—ADAMTS1, obtenido en dos colonias, con *Kpn* I y *Bam* HI para comprobar que el inserto de ADAMTS1 es correcto. (a) Esquema de los fragmentos esperados según las dianas existentes en el inserto y en el vector. (b) Fotografía del gel de agarosa en que se han separado los productos de la digestión (M: 1 kb Ladder)

Figura 3.9.- Digestión del plásmido pCR-SK(-)—ADAMTS1 con las enzimas de restricción *Apa* I y *Not* I.

(a) Esquema del plásmido con la indicación de los puntos de corte esperados.

(b) Fotografía del gel de agarosa donde se han separado los productos de la digestión de los plásmidos obtenidos de dos colonias (1-2) para comprobar que los fragmentos originados son los esperados (M: 1 kb Ladder)



El plásmido pZeoSV2(+) tiene un tamaño de 3515 pb e incluye un poliligador; al digerirlo con las mismas enzimas de restricción que el cDNA, y ligarlo luego con él, se obtendrá una construcción en la que el cDNA de ADAMTS1 estará en antisentido (pZeoSV2(+)—ADAMTS1).

Una vez puestas a transformar las bacterias DH5 α con estas construcciones, se obtienen diversas colonias que supuestamente las contienen, lo cual se comprueba mediante PCR (con los cebadores DES-1122—DES-2058), como se observa en la **figura 3.10**. De las colonias en que se ha dado el resultado correcto, se seleccionan dos de cada tipo, y se obtienen los plásmidos correspondientes. Estos plásmidos se secuencian por uno de los extremos, utilizando el cebador T7, y se constata que el inserto es correcto.

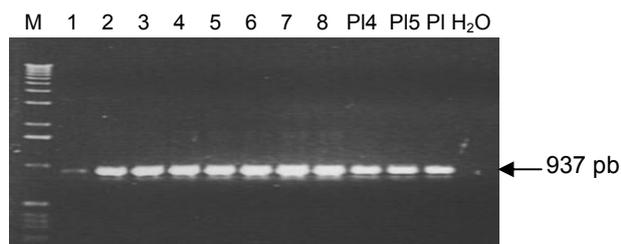


Figura 3.10.- Productos de la PCR en que se comprueba si las diferentes colonias obtenidas tras la transformación de bacterias DH5 α con las construcciones de pZeoSV2 contienen efectivamente el plásmido. Se han utilizado cebadores DES-1122 y DES-2058, y el producto debe ser de 937 pb, si las bacterias contienen el plásmido. Se observa que todas las colonias contienen el plásmido.

PI, PI4 y PI5 son controles positivos (plásmidos); **H₂O**, el control negativo; **M** es el marcador de tamaño 1kb Ladder; y los carriles **1-8** corresponden a las diversas colonias probadas.

3.3.2.2.- Transfección de anti-ADAMTS1 en células B2

Se realizaron inicialmente transfecciones estables de la región codificante de ADAMTS1 en antisentido en el vector de expresión pZeoSV2(+)-ADAMTS1. En la **figura 3.1** se observaba que las células del clon B2 expresaban el gen en abundancia.

En los apartados 3.3.3, 3.3.4 y 3.3.5 del presente trabajo se describe el efecto que las transfecciones estables de estas construcciones tienen sobre las características metastásicas de los clones transfectados, así como su efecto *in vivo* (es decir, tras su inyección en ratones).

Una vez realizado el proceso de transfección como se describe en el apartado 3.2.4, es necesario comprobar que se ha conseguido que el DNA foráneo permanezca en las células transfectadas. Para ello, se lleva a cabo una selección de algunos clones celulares

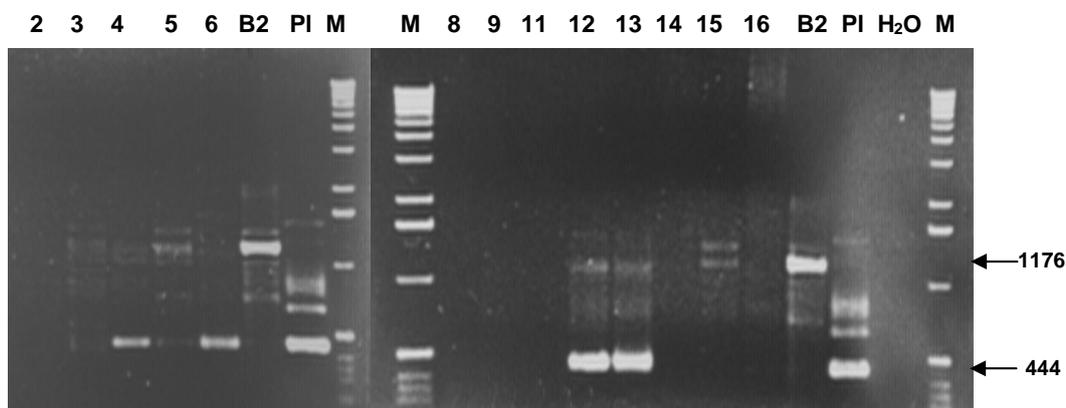


Figura 3.11 .- Productos de la PCR de comprobación con DNA de los clones de B2 resistentes a zeocina. Se han empleado los cebadores DES-1330 y DES-1773.

M: marcador de tamaño 1 kb Ladder; los carriles **2 a 16** corresponden a diversos clones analizados; **B2** sirve como control del tamaño del producto que se obtiene a partir de DNA genómico; **PI** (fásmido ADAMTS1) sirve como control del tamaño del producto que se obtiene del DNA insertado; **H₂O** es el control negativo de la PCR.

La banda de 444 pb es la debida al inserto de cDNA. La banda de 1176 pb se debe al DNA genómico, ya que entre las secuencias de los dos cebadores existen dos intrones de 410 y 322 pb.

Se seleccionan los clones en que hay los dos productos (444 y 1176 pb).

cultivándolos en un medio con zeocina a lo largo de 4-5 semanas. Una vez seleccionados diversos clones antiADAMTS1-B2, se realiza una extracción de DNA de las células correspondientes, además de controles con células que no se han sometido a transfección, y otros de células que se han sometido a transfección con el plásmido pZeoSV2 (+).

A continuación, el DNA se amplifica mediante PCRs con los cebadores DES-1330 y DES-1773. Las secuencias de estos cebadores se encuentran, respectivamente, en los exones 2 y 4, de manera que la amplificación del cDNA (procedente del plásmido que se ha introducido artificialmente) originará un producto de 444 pb (ver secuencia del cDNA de la figura 3.2), mientras que la amplificación del DNA genómico tiene que originar un producto de 1176 pb (444 pb de los exones más 410 pb del intrón 2 más 322 pb del intrón 3). La detección del producto de 444 pb sirve como prueba de que el cDNA está efectivamente en el interior de las células del clon correspondiente. En la **figura 3.11** se observa un ejemplo de los resultados de estas PCRs.

De todos los clones probados, se seleccionan aquellos en que se ha obtenido la banda de 444 pb: de los clones de B2, se seleccionan los denominados 4, 5, 6, 12 y 13. Dado que la PCR ha fallado en muchos de los clones, se prueba una nueva PCR con otra pareja de cebadores (DES-1122 y DES-2058), en los casos en que la primera falló o era dudosa. Las secuencias de estos cebadores se encuentran, respectivamente, en los exones 1 y 5, de manera que la amplificación del cDNA (procedente del plásmido que se ha

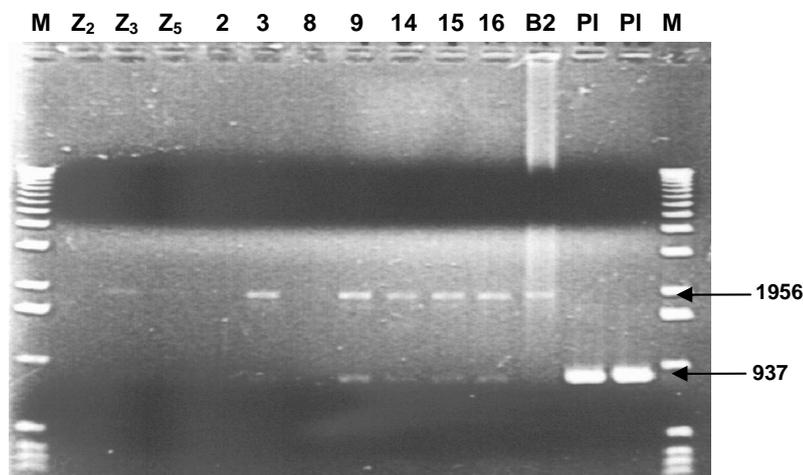


Figura 3.12.- Productos de la PCR de comprobación con clones de B2 resistentes a zeocina en que los resultados de la PCR anterior eran dudosos. Aquí se han empleado los cebadores DES-1122 y DES-2058.

M: marcador de tamaño 1 kb Ladder; los carriles **Z₂**, **Z₃** y **Z₅** corresponden a células de B2 con el plásmido pZeoSV2 (sin inserto). Los carriles **2 a 16** corresponden a los diversos clones analizados. **B2** sirve como control del tamaño del producto que se obtiene a partir de DNA genómico; **PI** (fásmido ADAMTS1) sirve como control del tamaño del producto que se obtiene del DNA insertado.

La banda de 937 pb es la debida al inserto de cDNA. La banda de 1956 pb se debe al DNA genómico, ya que entre las secuencias de los dos cebadores existen tres intrones de 410, 322 y 287pb.

Se seleccionan los clones en que hay los dos productos (937 y 1956 pb).

introducido artificialmente) originará un producto de 937 pb (ver secuencia del cDNA de la figura 3.2), mientras que la amplificación del DNA genómico tiene que originar un producto de 1956 pb (937 pb de los exones más 410 pb del intrón 2, más 322 pb del intrón 3, más 287 pb del intrón 4). La detección del producto de 937 pb sirve como prueba de que el cDNA está efectivamente en el interior de las células del clon correspondiente. El resultado se observa en la **figura 3.12**. Los productos esperados aparecen en todos los casos salvo en 2 y 8. Por tanto, se seleccionan también 3, 9, 14, 15 y 16.

A continuación, se someten todos los clones seleccionados a una prueba Southern en que se digiere el DNA de cada clon con las enzimas Xba I y Eco RI, y los fragmentos resultantes, separados electroforéticamente y transferidos a una membrana, se hibridan con una sonda del cDNA de ADAMTS1 (secuencia completa). En la **figura 3.13** se observan los resultados de esta hibridación.

En la prueba Southern se han incluido: 1) un control de DNA procedente de células transfectadas con los plásmidos pZeoSV2(+) sin inserto, y 2) un control de DNA del clon original, sin transfectar. Además, para orientar sobre la posición de los fragmentos que habrían de corresponder al plásmido con que se transfecta, se incluyó en la electroforesis el producto de la digestión de dicho plásmido (que no se muestra en las fotos porque se ha recortado).

Los tamaños de los fragmentos que se observan corresponden: los más grandes (8,7 kb) al DNA genómico, y los de 1,3 y 3,2 kb al cDNA del plásmido en situación episómica (puesto que existe una diana para Eco RI en la posición 1268 del cDNA de ADAMTS1, que

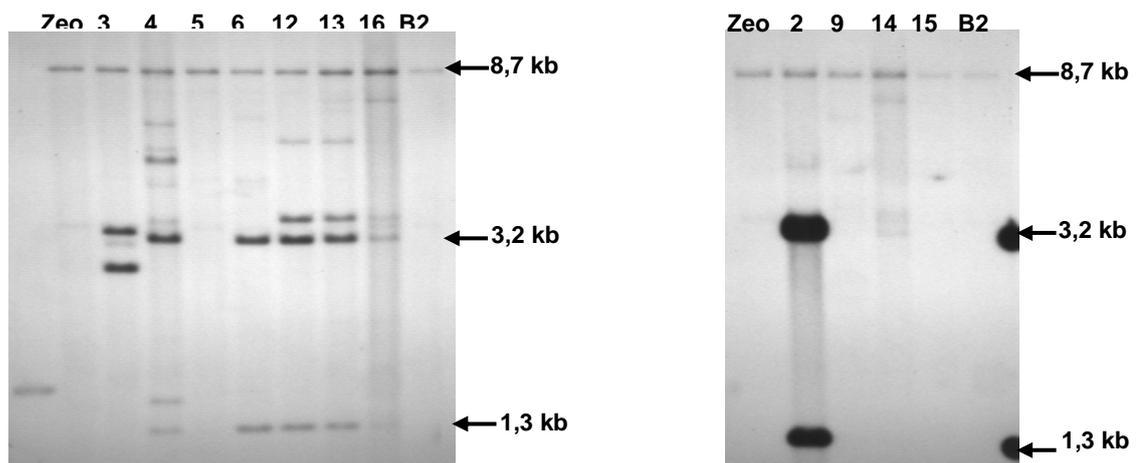


Figura 3.13 .- Prueba Southern para comprobar el éxito de la transfección de los clones de B2 resistentes a zeocina. Se ha digerido el DNA de los diferentes clones con las enzimas Xba I y EcoRI, y se ha hibridado con una sonda de ADAMTS1 completo. Sólo se han sometido a esta prueba los clones que previamente se habían seleccionado mediante PCR.

La banda superior es de unas 8,7 kb, y se corresponde con el ADAMTS1 genómico. En varios de los clones se aprecia un DNA episómico o insertado de ADAMTS1 (señales de 1,3 y 3,2 kb), especialmente en el clon 2. Las otras bandas que se aprecian pueden corresponder a inserciones anómalas de ADAMTS1.

lo divide en los dos fragmentos mencionados). Los fragmentos de otros tamaños pueden corresponder al cDNA insertado en el DNA genómico.

Teniendo en cuenta las imágenes obtenidas tras la prueba Southern, se seleccionan un par de clones derivados por transfección utilizando como criterio la intensidad de la señal, que orienta sobre el número de copias que existen en el interior de las células.

De los clones derivados de B2, no se observa ninguna señal en 5, 9, 14 y 15; la señal más intensa corresponde al clon 2, que se selecciona junto con el 12 (aunque se podría haber elegido también cualquiera de los otros).

Las células de los clones seleccionados se cultivan en las condiciones habituales (con zeocina) para obtener RNA y poder valorar la expresión de ADAMTS1 mediante una prueba Northern. En la **figura 3.14** se muestran las imágenes de la hibridación entre el RNA de las células que finalmente se han incluido (el B2 original, el transfectante con el plásmido “vacío” y los tranfectantes 2 y 12) con sondas de ADAMTS1 y GAPDH.

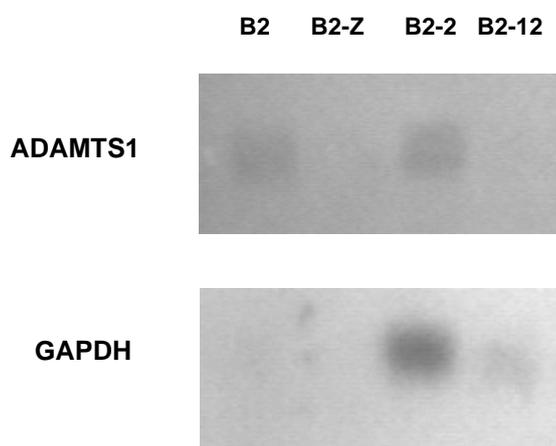


Figura 3.14 .- Expresión de ADAMTS1 y GAPDH en los clones transfectados con anti-ADAMTS1, que se habían seleccionado previamente después de comprobar la existencia de los plásmidos en las células mediante una prueba Southern. El clon original (sin transfectar) es B2; el clon B2-Z es de células transfectadas con el plásmido pZeoSV2 sin inserto de ADAMTS1; los clones B2-2 y B2-12 son de células transfectadas con pZeoSV2-antiADAMTS1.

3.3.3.- Cambios en la capacidad adhesiva *in vitro* de las células transfectadas

Los experimentos que se explican en el apartado 3.2.6 se hicieron por sextuplicado partiendo de dos densidades celulares distintas, para ver si el grado de confluencia de las células afectaba a su capacidad de adhesión a las diversas macromoléculas probadas.

Los estudios de adhesión *in vitro*, indican (aunque con limitaciones) el comportamiento de las células *in vivo* sobre las matrices extracelulares y las membranas basales. Las células tumorales pierden la capacidad de interaccionar y anclarse sobre las matrices extracelulares (que sí tienen las células epiteliales no malignas) debido a la expresión alterada de moléculas de adhesión específicas que son las responsables de la

adhesión sobre cada uno de los componentes de dichas matrices extracelulares. En el presente trabajo, se planteó averiguar si los niveles de expresión de ADAMTS1 podían modificar la capacidad de adhesión de las células B2 a los distintos componentes, utilizados como sustratos.

El Matrigel es un preparado sintético comercial que contiene distintos componentes de la matriz extracelular: fibronectina, laminina, glicosaminoglicanos y colágeno IV. Gelatina es el nombre que se da al colágeno parcialmente degradado, lo que origina a un conjunto de fragmentos que contienen epítomos para integrinas. Las otras macromoléculas probadas son componentes de la matriz extracelular con diferentes funciones: la fibronectina y la laminina son proteínas fibrosas que confieren propiedades adhesivas a la matriz extracelular; los colágenos también son proteínas fibrosas, pero las propiedades que confieren son más bien estructurales; el ácido hialurónico es un glicosaminoglicano sencillo, una cadena de polisacáridos compuesta alternativamente por N-acetilglucosamina y ácido glucurónico.

En la **Tabla 3.2.-a** se especifica la cantidad media de radiactividad (expresada en cuentas por minuto, cpm), que se mide en los pocillos que contienen los diferentes sustratos; en la tabla también se incluyen las desviaciones estándar correspondientes a las seis mediciones realizadas; por tanto, los coeficientes de variación ((desviación estándar/media) x 100) fueron, salvo excepciones, inferiores al 10%, de manera que la reproducibilidad del experimento fue buena.

En la **Tabla 3.2.-b** se expresa el porcentaje de unión de las células a los diversos sustratos en relación a la unión que se da con el plástico (que sirve como blanco y se considera un 100%). Se observa, en primer lugar, que no existen diferencias superiores a un 15% (salvo un par de excepciones) entre los resultados con alta y con baja densidad celular. Por otro lado, en casi todos los casos se observa una disminución similar de la adhesividad con respecto a la unión al plástico (como máximo un 30%); pero en el caso del ácido hialurónico, la proporción de unión al sustrato es muy baja en las células transfectadas con antiADAMTS1 (como media, un 6%).

En la **Tabla 3.2.-c** se expresa la adhesión relativa de las células MXT-B2 transfectadas con antiADAMTS1 con respecto a la línea MXT-B2. En casi todos los casos, la adhesión al correspondiente sustrato era muy similar en ambas líneas (lo que se pone de manifiesto porque los valores son próximos a cien): sólo resultaba ser marcadamente inferior cuando el sustrato era colágeno I, y sólo cuando la densidad celular era alta.

En cuanto a la morfología de las células, por lo que se refiere a su extensión ("*spreading*") y a su asociación con otras en grupos, las características de las dos líneas cuando se ponían en contacto con los diferentes sustratos se resumen en la **Tabla 3.3**. La capacidad de extensión de las células B2 es máxima en el caso de crecer sobre plástico o sobre un sustrato como el Matrigel, que es un material comercial compuesto por diversos componentes de la matriz extracelular (fibronectina, laminina, colágeno IV,

glicosaminoglicanos). Esta capacidad disminuye algo cuando las células crecen sobre colágeno I, fibronectina o vitronectina, y es mínima, o incluso desaparece, cuando los sustratos son gelatina, colágeno IV o laminina. En el caso del ácido hialurónico, el tipo de agregados que se forma no permite apreciar la capacidad de extensión de las células.

Por su parte, las células B2 transfectadas con ADAMTS1 en antisentido, al igual que las B2, presentan el máximo de extensión cuando crecen sobre plástico o Matrigel, pero también cuando lo hacen sobre colágeno I o fibronectina, lo que supone un ligero aumento de esta capacidad con respecto a las B2. Hay una cierta disminución de la capacidad de extensión con respecto a B2 cuando las células B2 antiADAMTS1 crecen sobre gelatina o vitronectina. Y, por último, el crecimiento de las células sobre laminina, colágeno IV o ácido hialurónico se caracteriza por una capacidad de extensión mínima o nula, como en el caso de B2.

a)

Línea celular	Densidad celular	cpm (media ± desviación estándar)								
		Plástico	Matrigel	Gelatina	Fibronectina	Vitronectina	Laminina	Ácido hialurónico	Colágeno IV	Colágeno I
MXT-B2	Baja	2296 ± 180	2455 ± 88	1770 ± 103	1936 ± 144	2153 ± 105	1732 ± 222	No valorable	1812 ± 117	2112 ± 130
	Alta	5532 ± 141	4872 ± 208	4052 ± 309	4477 ± 237	4617 ± 117	3894 ± 534	No valorable	4404 ± 90	6618 ± 600
MXT-B2-antiADAMTS1	Baja	2975 ± 173	2853 ± 68	2154 ± 124	2611 ± 183	2842 ± 206	2191 ± 126	213 ± 50	2492 ± 180	2638 ± 84
	Alta	7367 ± 184	6533 ± 94	5624 ± 255	6118 ± 457	5834 ± 104	4940 ± 255	337 ± 61	5391 ± 194	5726 ± 92

b)

Línea celular	Densidad celular	Matrigel	Gelatina	Fibronectina	Vitronectina	Laminina	Ácido hialurónico	Colágeno IV	Colágeno I
MXT-B2	Baja	106,9	77,1	84,3	93,8	75,4	No valorable	78,9	92,0
	Alta	88,1	73,2	80,9	83,5	70,4	No valorable	79,6	119,6
MXT-B2-antiADAMTS1	Baja	95,9	72,4	87,8	95,5	73,6	7,2	83,8	88,7
	Alta	88,7	76,3	84,0	79,2	67,1	4,6	73,2	77,7

c)

Línea celular	Densidad	Matrigel	Gelatina	Fibronectina	Vitronectina	Laminina	Colágeno IV	Colágeno I
B2-antiADAMTS1 / B2	Baja	89,69	93,92	104,08	101,87	97,63	106,14	96,40
	Alta	100,69	104,22	103,79	94,89	95,26	91,92	64,97

Tabla 3.2.- Características de adhesión de las líneas celulares estudiadas a los diferentes sustratos probados. En la tabla a) se muestran los datos de radiactividad obtenidos; en la tabla b) se muestran los porcentajes de adhesión relativos a la que presentan las células al plástico; en la tabla c) se muestran los porcentajes de adhesión de las células transfectantes en relación a las originales sin transfectar. Ver explicación en el texto.

Línea celular	Plástico	Matrigel	Gelatina	Fibronectina	Vitronectina	Laminina	A.hialurónico	Colágeno IV	Colágeno I
B2	100% extensión Agregados	100% extensión	25% extensión	75% extensión	75% extensión	0% extensión Células aisladas	Grandes agregados de células	0% extensión	90% extensión
B2 antiADAMTS	100% extensión Grupos redondeados	100% extensión	10-15% extensión	100% extensión	50% extensión	0% extensión Células aisladas	0% extensión Células aisladas	0% extensión Células aisladas	100% extensión
B2 en relación a B2 antiADAMTS1	=	=	↓	↑	↓	=		=	↑

Tabla 3.3.- Características morfológicas y de asociación de las células estudiadas en los diversos sustratos probados. Los símbolos =, ↑ y ↓ representan la igualdad, el aumento o la disminución de la capacidad de extensión.

3.3.4.- Cambios en la capacidad migratoria *in vitro* de las células transfectadas

En la **Tabla 3.4** se especifica la cantidad media de radiactividad (expresada en cuentas por minuto, cpm), que se mide en las células que se añaden inicialmente al compartimiento superior de la cámara de Boyden, la radiactividad media medida en las células que pasan al compartimiento inferior de la cámara, junto con el porcentaje que esta última cantidad supone con respecto a la primera (y que representa el porcentaje de células que migran a través del fitro impregnado de colágeno IV). En la última columna se presenta el porcentaje de células transfectadas que migran con respecto a las células sin transfectar (esto mismo se presenta graficamente en la figura 3.15).

Según estos resultados, las células B2 antiADAMTS1 tienen una mayor capacidad de migración.

Líneas celulares	Radiactividad media (cpm)		%	% relat
	Células iniciales	Células migradas		
MXT-B2 (control)	33570	359	1,07	100
MXT-B2-antiADAMTS1	46290	830	1,79	167

Tabla 3.4.- Cálculo de la relación entre las capacidades migratorias de las células B2 y las transfectantes B2 antiADAMTS1. Las cifras que se presentan son las medias de seis medidas. La primera columna de porcentajes se calcula dividiendo el número de células migradas por el de células iniciales; la segunda columna de porcentaje se obtiene dividiendo los porcentajes anteriores por el de B2 (1,07).

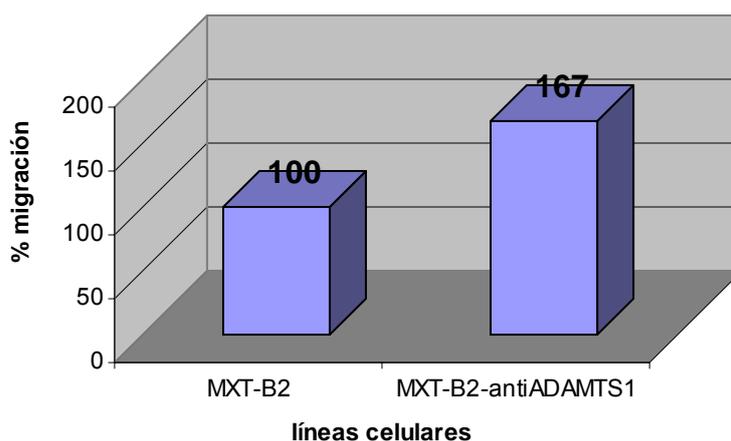


Figura 3.15.- Comparación gráfica entre las capacidades migratorias *in vitro* de las células B2 y las transfectantes B2-antiADAMTS1.

3.3.5.- Cambios en la capacidad tumorigénica y metastásica *in vivo* de las células transfectadas

Para determinar si los niveles reducidos de la expresión de ADAMTS1 en la línea B2 se correlacionaban con la agresividad del tumor *in vivo*, se analizó el tiempo de latencia o tiempo transcurrido entre la inoculación de las células y la detección de un tumor de 10 mm de diámetro máximo. Asimismo, se incluyeron en los experimentos las células de la línea C1.1 (variante que desarrolla metástasis experimentales), como control de metástasis espontáneas.

Los resultados de los experimentos *in vivo* se recogen en la **tabla 3.5**. Los ratones inoculados con las células transfectantes presentaron un período de latencia más largo que el de los inoculados con las células B2 originales (de hecho, más del doble en ambos experimentos); es decir, que los tumores tardaban más en crecer hasta alcanzar un tamaño de 10 mm cuando la expresión de ADAMTS1 estaba parcialmente bloqueada. Sin embargo, el crecimiento a partir de este momento era igualmente rápido en los ratones inoculados con B2 y con B2-antiADAMTS1: en todos los casos transcurrieron unos 8 días entre el momento en que los tumores llegaron a los 10 mm y el momento en que tuvieron que extirparse porque habían alcanzado un volumen de 1 cm³.

Por otra parte, ni los ratones inoculados con las células B2 ni los inoculados con las células B2-antiADAMTS1 desarrollaron metástasis espontáneas detectables en la necropsia practicada a los 90 días después de la exéresis del tumor primario. Por el contrario, los ratones inoculados con la variante metastásica C1.1 fueron sacrificados entre los 29 y los 35 días después de la inoculación de las células metastásicas porque aparecieron moribundos, y se detectó la presencia de metástasis pulmonares en todos los ratones

	Células inoculadas	latencia (días)	exéresis (días)	Número de animales	
				tumorigenicidad	Metástasis espontáneas en pulmón
Experimento I	B2	11 ± 3	19 ± 2	5/5	0/5
	B2 antiADAMTS1	25 ± 4	33 ± 3	5/5	0/5
	C1.1	10 ± 1	18 ± 2	5/5	5/5
Experimento II	B2	12	20 ± 3	5/5	0/5
	B2 antiADAMTS1	26 ± 5	34 ± 4	5/5	0/5
	C1.1	9	19 ± 1	5/5	5/5

Tabla 3.5- Incidencia de tumores y metástasis espontáneas producidas por inyección ortotópica de las células de las distintas líneas en los ratones. El tiempo de latencia es el transcurrido entre la inyección de las células y la aparición de un tumor de 10 mm de diámetro máximo. Exéresis indica el tiempo transcurrido desde la inyección hasta la exéresis del tumor.

Tumorigenicidad expresa la incidencia de tumores (de un volumen de al menos 1 cm³) en relación al número total de ratones a los que se inyectaron las células.

Metástasis espontánea recoge la incidencia de las metástasis espontáneas, y se expresa como el número de ratones que llegaron a tener focos en el pulmón con respecto al número total de ratones en los que se desarrolló un tumor. Los datos se obtuvieron en el momento del sacrificio del ratón.

**4.- ESTUDIO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LA INFLUENCIA DE CIITA SOBRE
CARACTERÍSTICAS ASOCIADAS AL FENOTIPO METASTÁSICO**

INTRODUCCIÓN

De las diferentes bandas con expresión diferencial que se detectaron e identificaron en el presente trabajo, la **8MDA** correspondía al **gen de la cadena β de HLA-DP** ("*Human MHC class II lymphocyte antigen (HLA-DP) beta chain*"). Este gen dejaba de expresarse casi completamente en la variante Lung-2, que es la más metastásica de las estudiadas en el modelo MDA-MB 435. La variación en la expresión de genes del MHC-II ya se había descrito en lesiones metastásicas de tumores de mama (131); en el presente trabajo se aportan datos sobre la relación entre la pérdida de expresión del gen de la cadena β de HLA-DP que se observaba en el análisis Northern y el aumento de la capacidad metastásica de las células tumorales.

El conocimiento actual sobre la regulación de la transcripción de los genes del MHC-II proviene del estudio del defecto de MHC-II (132). Estos estudios han conducido a la identificación de CIITA y RFX, dos transactivadores esenciales para la expresión de MHC-II (133). En concreto, CIITA representa un papel fundamental en la expresión de los genes HLA de clase II en los tipos celulares en los que se expresa. Mientras que RFX y otros factores de transcripción se expresan ubicuamente, CIITA se expresa diferencialmente siguiendo un patrón correlacionado con el de las moléculas del MHC-II (134,135). Se cree que CIITA funciona como coactivador transcripcional, que interactúa con factores unidos a los promotores de MHC-II (136).

Tomando en cuenta estos datos, en el presente trabajo se ha pretendido correlacionar el nivel de expresión de los genes de MHC-II, que se encontraron significativamente disminuidos en la variante más metastásica (Lung-2), con los niveles de mRNA de CIITA. Y, una vez hecho esto, se ha estudiado la influencia que la expresión de CIITA puede tener sobre la capacidad tumorigénica y metastásica de las células, para lo cual se han transfectado las células Lung-2 con el gen de CIITA de manera que aumente su expresión en dichas células.

4.1.- MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.1.- Condiciones de los cultivos celulares.

Las variantes celulares utilizadas en esta parte del estudio fueron las denominadas Parental, Lung-2 y Brain-1 de la línea MDA-MB-435. La variante Lung 2 tiene una gran capacidad metastásica espontánea, y se obtuvo a partir de una metástasis pulmonar originada por un tumor de mama primario. La variante Brain-1 tiene, en cambio, poca capacidad metastásica.

Todas las variantes se cultivaron en medio Ham F-12 (Gibco, EEUU), con un suplemento de un 10% de suero fetal bovino, piruvato sódico, aminoácidos no esenciales, L-glutamina y una solución vitamínica (2x) (Gibco, EEUU). Las células se cultivaron sobre

plástico y se incubaron en un ambiente de 95%aire-5%CO₂ a 37 °C en un incubador humidificante.

Antes de comenzar los experimentos *in vitro* y la inoculación en los ratones, se comprobó la ausencia de *Mycoplasma* en los cultivos con el equipo Gene-Probe Mycoplasma T.C. (de Gene-Probe Inc., EEUU).

4.1.2.- Preparación de transfecciones estables.

Para llevar a cabo las transfecciones estables, las células se sometieron a la transfección cuando se encontraban al 60% de confluencia en placas de seis pocillos (Costar, EEUU). La transfección se realizó mediante la incubación con 12 µg de cDNA de CIITA dentro del vector de expresión EBO-76PL (proporcionado por el Dr Jean Villard, de la Escuela de Medicina de la Universidad de Ginebra) utilizando Lipofectamina (Life Technologies, EEUU) según las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron durante 2 días y luego se seleccionaron con 500 mg/L de G418 (concentración activa). Los clones se aislaron, expandieron y cribaron para comprobar la integración de CIITA mediante análisis southern; también se midió la expresión de MHC clase II mediante citometría de flujo.

Citometría de flujo: Las células no transfectadas y los transfectantes estables se clasificaron por FACS (*fluorescence-activated celular selection*) según su expresión de los antígenos MHC de clase II. La citometría de flujo se realizó utilizando anticuerpos marcados con FITC (isotiocianato de fluoresceína). Los antígenos DP, DQ y DR contra las moléculas de MHC humana clase II son de Serotec, UK. Para detectar las tinciones inespecíficas se utilizó un anticuerpo isotípico de control marcado con FITC.

4.1.3.- Pruebas de tumorigenicidad y metástasis espontáneas.

Se utilizaron ratones BALB/c (atímicos desnudos, sin linfocitos T) y Scid (con inmunodeficiencia combinada, sin linfocitos T ni B), todos ellos procedentes del área de producción animal de IFFA-CREDO Inc. (Francia). No se comenzó a emplearlos hasta que no cumplieron 8 semanas, y todo el tiempo se mantuvieron en cabinas de flujo laminar en condiciones libres de patógenos, según las directrices de la institución (Institut de Recerca Oncològica).

Las células cultivadas se recogieron de los cultivos subconfluentes (50-70% de confluencia) mediante un tratamiento corto con tripsina al 0,25% y una solución de EDTA 0,02%. Las células se lavaron con medio suplementado y luego se resuspendieron en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) para poder ser inyectadas. En los experimentos *in vivo*, sólo se emplearon suspensiones celulares en que la viabilidad fuera superior al 90% (determinada mediante la prueba de exclusión de azul tripano). Las suspensiones de células se prepararon a una concentración de 10⁷ células viables por mL.

Para realizar la implantación ortotópica de células en la mama de las ratonas, una vez anestesiadas, se emplearon inóculos de 10^6 células en 50 μ L de HBSS. El crecimiento de los tumores se monitorizó dos veces por semana, y los volúmenes de los tumores se calcularon mediante la medición con un pie de rey de dos diámetros ortogonales (x e y), utilizando la fórmula: [volumen= $\frac{1}{2} xy^2$].

Los tumores primarios se extirparon de los ratones anestesiados cuando alcanzaron un volumen de 1-5 mm^3 , y las incisiones en la piel se cerraron con grapas quirúrgicas. La mayoría de los animales continuó viviendo durante más de 100 días.

Los ratones se sacrificaron y se analizaron a diferentes tiempos, como se indica en la **Tabla 4.1**. Todos los órganos viscerales se examinaron para detectar la presencia de crecimiento tumoral, tanto *de visu* como con criterios histológicos. Los pulmones se separaron y fijaron para determinar la presencia de metástasis.

4.2.- RESULTADOS

El primer paso para establecer una relación entre los genes de la cadena β de HLA-DP (banda 8MDA) y del transactivador CIITA era comprobar la gran similitud de la expresión de ambos genes, al menos en lo que respecta a las líneas celulares que se estudiaban (Parental, Lung-2 y Brain-1). En la **figura 4.1** se muestran las imágenes correspondientes a las pruebas Northern obtenidas con sondas de ambos genes. Se puede comprobar que, en los dos casos, la mayor expresión se da en la línea Brain-1, de escasa capacidad metastásica, y la menor (en el caso de CIITA, prácticamente inexistente) en la línea Lung-2, de gran capacidad metastásica. En todos los casos se trata de cultivos *in vitro*.

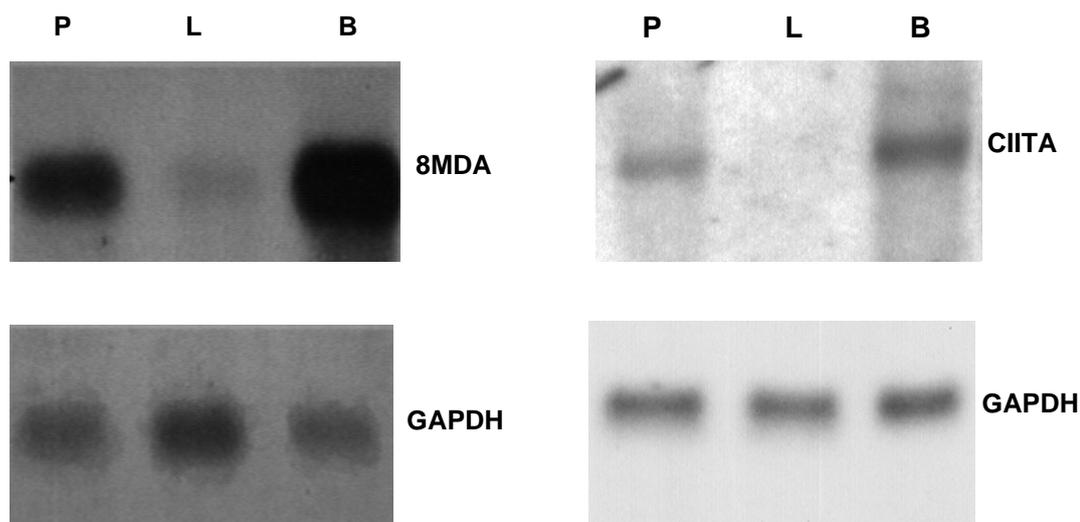


Figura 4.1.- Expresión comparada de los genes de la cadena β de HLA-DP y de CIITA.

Para probar la validez de estas observaciones, se examinó la expresión de las moléculas del MHC-II en la superficie celular mediante un análisis por FACS. Como puede observarse en la **figura 4.2**, no hay expresión de moléculas del HLA-DR, HLA-DP ni HLA-DQ en la superficie de las células Lung-2, lo cual concuerda con la expresión diferencial observada por RAP-PCR y confirmada por análisis Northern. Los niveles de expresión intermedios detectados en el caso de las células parentales reflejan el hecho de que estas consisten en una mezcla de poblaciones celulares de capacidad diversa en cuanto a la expresión del gen de la cadena β de HLA-DP.

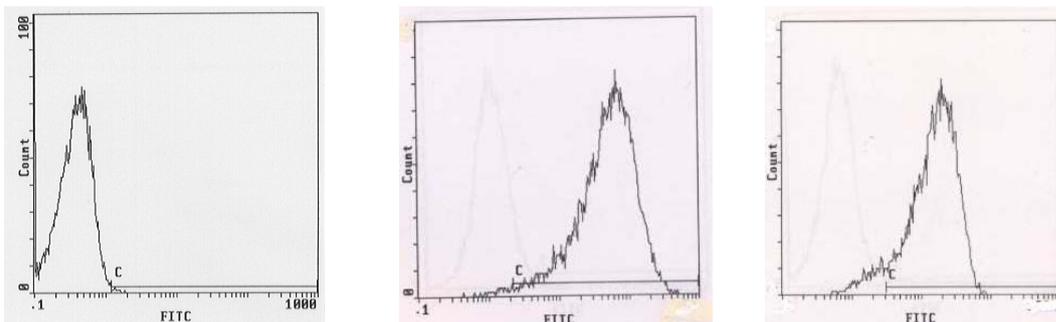


Figura 4.2.- Análisis por FACS de las células Lung-2 (a), Brain-1 (b) y Lung-2 tras la transfección con cDNA de CIITA (c).

Puesto que se había detectado una asociación entre los niveles de expresión de este gen y la distinta capacidad metastásica de las líneas celulares estudiadas (24) (más expresión – menos capacidad), se resolvió analizar dicha expresión en tumores primarios y metástasis pulmonares espontáneas desarrolladas en ratones atímicos tras el implante ortotópico de células de las tres líneas en estudio. Los resultados del análisis Northern (que no se muestran) eran similares a los obtenidos *in vitro*. Aunque el número de focos metastásicos que se generaban tras implantar células Lung-2 era mucho mayor que el obtenido tras implantar células Brain-1, el hecho de que hubiese focos pulmonares espontáneos a partir de tumores de estas últimas sugería que la disminución de la expresión del gen de la cadena β de HLA-DP no era imprescindible para que se produjeran metástasis pulmonares a partir de células MDA-MB 435. Y dado que no se habían observado diferencias entre las tres líneas celulares mediante análisis Southern (datos no mostrados), se concluyó que la disminución (o ausencia) de expresión del gen de la cadena β de HLA-DP tenía que deberse a algún tipo de control transcripcional.

Una vez establecida la correlación entre las expresiones de los genes de CIITA y de la cadena β de HLA-DP en el modelo celular MDA-MB 435, se planteó si la disminución de la expresión de este último podía estar controlada por la variación (disminución) de la expresión de CIITA, y si esta se relacionaba con la proliferación y celular y el crecimiento

tumoral. Para ello, se transfectó el cDNA de CIITA en las células Lung-2 con el objetivo de aumentar su expresión. Se pudo comprobar entonces que la proliferación *in vitro* de las células Lung-2 no variaba por el subsiguiente aumento de la expresión de la cadena β de HLA-DP (datos no mostrados).

A continuación se investigó el efecto que podría tener el aumento de la expresión de CIITA sobre el crecimiento *in vivo* de los tumores. Para ello, se inocularon 1×10^6 células Lung-2 (como experimento control) o Lung-2 transfectadas con CIITA en la mama de dos tipos de ratones Balb/c: unos atímicos desnudos (que carecen de linfocitos T) y otros SCID (con inmunodeficiencia combinada, que carecen de linfocitos B y T).

Como se observa en la **Tabla 4.1**, la aparición de tumores en los ratones atímicos a los que se inocularon las células transfectadas disminuyó notablemente en comparación con los ratones control. Además, el tiempo que transcurría entre la implantación de las células y la detección de tumores primarios aumentó, y entre un 25 y un 50 % de estos tumores sufrieron una regresión después de haber alcanzado unos $0,4 \text{ cm}^3$. La expresión de CIITA y de la cadena β de HLA-DP se mantuvo (datos no mostrados). Solo desarrolló metástasis pulmonares un ratón (lo cual se determinó en el momento del sacrificio, seis meses después de la excisión del tumor primario).

Por su parte, todos los ratones SCID a los que se inocularon las células Lung-2 transfectadas desarrollaron tumores. Además, estos tumores crecieron igual de rápido que los de los ratones control y no se observó la regresión de ninguno de ellos. Es de destacar que las células transfectadas no originaron metástasis pulmonares en los ratones SCID, solamente se detectaron en ganglios linfáticos axilares de la mitad de los ratones.

Estos resultados sugieren la intervención del sistema inmune del huésped vía linfocitos B, *natural killers* o macrófagos, que todavía se encuentran presentes en los ratones atímicos (pero no en los SCID) y podrían rechazar a las células tumorales *in vivo*. Por otro lado, la ausencia de metástasis pulmonares en los ratones SCID, en los que no se había observado un rechazo de los tumores, podría estar relacionada con la protección pulmonar contra células foráneas que presentan niveles altos de moléculas de la cadena β de HLA-DP o de CIITA.

Receptor	Línea celular inyectada (i.m.f.p.)	Detección del tumor	Latencia (días)	Tumorigenicidad	Cirugía (días)	Regresión del tumor	Metástasis Espontánea
Ratón desnudo Balb/c	CIITA-435-Lung2	14 / 30 (46,6%)	45 – 60	8 / 30 (26,6%)	65 – 70	6 / 14 (42,8%)	1 / 8 (P) (12,5%)
	435-Lung2 (control)	20 / 20 (100%)	27 – 30	20 / 20 (100%)	35 – 45	0 / 20 (0%)	18 / 20 (P) 5 / 20 (25%) (P,G)
Ratón SCID Balb/c	CIITA-435-Lung2	8 / 8 (100%)	28	8 / 8 (100%)	35	0 / 8 (0%)	4 / 8 (50%) (P,G)
	435-Lung2 (control)	8 / 8 (100%)	28	8 / 8 (100%)	35	0 / 8 (0%)	4 / 8 (50%) (P,G) 4 / 8 (50%) (P)

Tabla 4.1- Incidencia de tumores y metástasis espontáneas producidas por inyección ortotópica de células CIITA-435-Lung2 en ratones desnudos atímicos o en ratones SCID.

Se inocularon 1×10^6 células (435-Lung2 transfectadas con el vector de expresión que contenía CIITA, y 435-Lung2 como control) en la mama de ratones hembra Balb/c desnudos o SCID. Los resultados de los ratones desnudos corresponden a cinco experimentos independientes, con incidencias similares. La incidencia de los tumores se expresa como el número de ratones con tumores con respecto al número total de ratones a los que se inyectaron las células. Los datos indican el número de ratones que tenían un tumor primario detectable (tamaño muy inferior a $0,4 \text{ cm}^3$). La latencia indica el tiempo transcurrido (en días) desde la inyección de las células hasta que el tumor alcanza en el ratón el tamaño indicado.

Tumorigenicidad expresa la incidencia de tumores (de un volumen de al menos $0,8 \text{ cm}^3$) en relación al número total de ratones a los que se inyectaron las células. Cirugía indica el día de la excisión del tumor (con un tamaño de $0,8 \text{ cm}^3$).

Regresión del tumor indica la incidencia de tumores que involucionaron después de haberse detectado y que en ningún momento alcanzaron los $0,8 \text{ cm}^3$. Se expresa como el número de tumores involucionados con respecto al número total de ratones con tumores detectables.

Metástasis espontánea recoge la incidencia de las metástasis espontáneas, y se expresa como el número de ratones que llegaron a tener focos en el pulmón (P) o en los ganglio linfáticos (G), con respecto al número total de ratones en los que se desarrolló un tumor. Los datos se obtuvieron en el momento del sacrificio del ratón.

5.- DISCUSIÓN

La formación de un tumor primario supone una serie de alteraciones moleculares y celulares que confieren a la(s) célula(s) la capacidad de eludir los mecanismos de control de la proliferación y diferenciación de las células normales, así como de influir en su microentorno tisular (137). Estos cambios incluyen también la adquisición de nueva vasculatura, una vez el foco de las células transformadas empieza a crecer y no le es suficiente el aporte de oxígeno, nutrientes y metabolitos que le llega por difusión (138). La progresión tumoral y la adquisición de la capacidad metastásica implican una serie de cambios adicionales en la expresión génica, que favorecen la diseminación de las células tumorales influyendo en los distintos pasos del proceso metastásico: en la invasión de los tejidos adyacentes, mediante la producción de enzimas proteolíticas, moléculas de adhesión, etc.; facilitando la circulación y supervivencia celular por los capilares sanguíneos y linfáticos; permitiendo eludir la vigilancia del sistema inmunitario del huésped; extravasando y colonizando nuevos tejidos, Todos estos cambios pueden culminar en un fenotipo maligno (139).

Sin embargo, la mera presencia de las células tumorales en un órgano o tejido distinto al del tumor primario no implica necesariamente la formación de una metástasis (18). El desarrollo de nuevos focos tumorales exige unas determinadas condiciones de compromiso entre el huésped y las células tumorales, que permitan su crecimiento. En resumen, el éxito de una célula tumoral en conseguir metastatizar, depende en parte de las alteraciones moleculares específicas originales del tumor, pero también de la inestabilidad genética que le permita, tras los diferentes cambios que origina, interactuar a su favor con el huésped y proliferar en un órgano secundario.

Cuando a mediados de los ochenta comenzó el descubrimiento de los genes supresores de metástasis (GSM) (140), se inició una búsqueda exhaustiva de nuevos GSM candidatos universales para distintos tumores, cuyo conocimiento -como había ocurrido con los genes supresores de tumores tales como p53- abría la esperanza a nuevos marcadores de pronóstico y posibles dianas terapéuticas. Sin embargo, hoy, a inicios del siglo XXI, se sabe que no siempre es así y que el papel de muchos de los genes identificados como supresores de metástasis está restringido a determinados tipos de tumores. A diferencia de los genes que están involucrados en el desarrollo del tumor primario, la mayoría de los genes que pueden determinar (o intervenir en) la formación de metástasis no presentan alteraciones en su secuencia, pero sí expresiones aberrantes (141,142).

Considerando todas las etapas del proceso, se sabe que, además de los productos de los genes supresores de metástasis, son muchos los productos génicos que intervienen simultánea o independientemente durante el proceso, y, en consecuencia, son muchas las alteraciones en la **regulación de su expresión**. El reto actual es poder identificar **cuáles son los genes y cuáles son las funciones** claves en la adquisición del fenotipo

metastásico. Este objetivo requiere el uso de modelos animales *in vivo*, bien caracterizados y asimilables a las situaciones clínicas, puesto que los modelos *in vitro* no reflejan apropiadamente el conjunto de caracteres del fenotipo metastásico (143).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que tampoco los modelos animales son siempre comparables a lo que sucede en la clínica: dada la inherente variabilidad y el comportamiento no-lineal de los sistemas biológicos, es posible que un determinado modelo no aporte la información de cada uno de los genes involucrados en las distintas etapas de la formación de metástasis. Considerando este aspecto, es importante enfocar el estudio en un modelo concreto, profundizar en él y determinar las vías y efectos modulados por un gen en particular, y posteriormente probar y verificar su papel en otros modelos tumorales, además de correlacionarlo con la patología y la evolución clínica de los pacientes. Y esto es lo que se ha pretendido en el presente trabajo.

5.1.- DETECCIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL FENOTIPO METASTÁSICO MEDIANTE RAP-PCR

La búsqueda de genes relacionados con el proceso metastásico ha sido un objetivo muy perseguido en los últimos años en la investigación sobre el cáncer. Para tratar de identificar nuevos candidatos, se han utilizado diferentes estrategias, que han dado un resultado desigual. Por ejemplo, técnicas como la transferencia de cromosomas, combinada con la clonación posicional, han permitido describir la existencia de genes supresores de metástasis (34-37), es decir que impiden la formación de metástasis espontáneas sin afectar al desarrollo y crecimiento del tumor primario.

Ahora bien, además de los llamados genes “inductores” o “supresores” de metástasis (cuya alteración en su expresión puede originar directamente la aparición o reversión del fenotipo metastásico), también se sabe que los cambios en la expresión de otros muchos genes pueden influir en este proceso. Es decir, pueden determinar su mayor o menor capacidad invasiva, angiogénica, etcétera. Estos genes pueden ser detectados mediante técnicas basadas en el análisis del mRNA. Entre ellas cabe destacar la hibridación diferencial (o la modificación que supone la hibridación sustractiva) y la representación diferencial (incluyendo las variantes de esta técnica).

Todas estas técnicas tienen como fundamento la comparación (directa o indirecta) del acervo de RNA de diversas poblaciones de células. La principal ventaja de la representación diferencial es que permite comparar simultáneamente varios clones celulares, mientras que la hibridación obliga a la comparación por parejas.

La técnica de la representación diferencial (*differential display*) debe su nombre al tipo de resultado que ofrece. Es la imagen de un gel de electroforesis (con, al menos, tantos carriles como poblaciones celulares se comparan), en el cual se pueden observar diferentes bandas de cDNA, obtenido a partir del RNA de partida, que muestran un mismo patrón, aunque la intensidad de algunas de las bandas es (o puede ser) distinta en cada población. Por tanto, es una disposición (*display*) en que las bandas que se comparan se encuentran yuxtapuestas, lo que permite determinar con relativa facilidad la existencia de diferencias en la intensidad. Cada banda corresponde a un cDNA que procede de un RNA, y se asume que existe una relación directa entre la intensidad de una banda y la cantidad del correspondiente RNA en la población celular. Por tanto, se puede deducir que la diferencia en la intensidad de las bandas representa una diferencia en la expresión de un determinado gen. También puede deducirse que cuanto más similares son los patrones que se obtienen a partir de dos poblaciones celulares, más parecidas son éstas en cuanto a expresión génica, y viceversa (aunque, lógicamente, la imagen que se obtiene en cada electroforesis no representa más que un muestreo del RNA existente en dichas poblaciones).

El antecedente inmediato de esta técnica fue la denominada AP-PCR (*arbitrarily primed PCR*) (144), en que el material de partida era DNA genómico. En ella se utilizaban

cebadores arbitrarios en unas PCRs realizadas a temperaturas bajas, de manera que se obtenían patrones de bandas constantes en unas condiciones concretas, pero anónimas por lo inespecífico de la PCR. Al comparar poblaciones celulares tumorales y no tumorales de un mismo individuo, se observaban diferencias cualitativas (presencia/ausencia) y cuantitativas (variación en la intensidad) de las bandas homólogas, lo que significaba que en las células había regiones genómicas representadas diferentemente; es decir, que si se partía de una cantidad igual de DNA genómico, podía deducirse que en las poblaciones tumorales se habían dado pérdidas o ganancias alélicas totales o parciales.

Ahora bien, este método también puede aplicarse para mostrar la similitud entre poblaciones celulares, que se deduce cuando no se observan diferencias entre los patrones (teniendo siempre en cuenta que la imagen que se obtiene no representa más que un muestreo del DNA existente en dichas poblaciones).

En el presente trabajo, se ha utilizado esta última posibilidad para comprobar la homogeneidad genómica de las variantes celulares estudiadas (que tenían distinta capacidad metastásica). En un trabajo anterior (130) se había comprobado la homogeneidad de las variantes celulares del modelo MDA MB-435, y las variantes que se han empleado aquí proceden de aquellas. Por su parte, la homogeneidad en el modelo MXT se ha comprobado en el curso de este trabajo, y queda aún más patente al comparar la imagen del RAP-PCR de células MXT con el de células tumorales de diferentes características (como C26 de colon y HaCa4 de melanoma). Esta comprobación resulta de gran importancia, puesto que permite asumir que las diferencias encontradas en la expresión génica a través del RAP-PCR probablemente no se deben a que las distintas variantes comparadas tengan diferente representación (en cuanto a número) de los genes.

Existen numerosos trabajos en los que se han identificado genes diferencialmente expresados entre células de diversos tipos utilizando el método de la representación diferencial. En muchas ocasiones se comparaban células tumorales con no tumorales, o metastásicas con no metastásicas, y se deducía una asociación de los genes identificados con la generación de tumores o de metástasis, respectivamente; sin embargo, cuando se utilizan tipos celulares de homogeneidad genómica desconocida (o incluso inexistente), las comparaciones de la expresión génica pueden resultar engañosas, puesto que nada permite excluir la posibilidad de que las diferencias se deban, al menos en parte, a las pérdidas o ganancias alélicas que se dan a menudo (y en grado muy diverso) en las células tumorales. Este problema puede soslayarse, como se ha hecho en el presente trabajo, mediante la utilización de modelos celulares en que las distintas variantes de diferente capacidad metastásica comparten un acervo genético común.

Si al realizar una RAP-PCR se utiliza RNA total como material de partida, existe una elevada probabilidad de aparición de bandas de cDNA procedentes de RNA ribosómico (rRNA), puesto que esta fracción representa más del 90% del total de RNA. En el presente

trabajo, se ha empleado RNA poliadenilado (mensajero) para tratar de evitarlo, aunque lógicamente la especificidad en la extracción no es absoluta, y siempre queda una proporción alta de rRNA en la muestra. Aún así, de las bandas clonadas ninguna resultó corresponder a un rRNA.

Para dar por válidos los resultados obtenidos en la RAP-PCR se ha valorado como requisito imprescindible la reproducibilidad de los patrones de bandas: debían observarse los mismos en al menos dos extracciones de RNA distintas; además, por razones prácticas, era conveniente también que el número de bandas detectadas por carril de electroforesis no fuera inferior a 20, y que no fueran difusas.

Otro requisito indispensable fue la comprobación de que las bandas no procedían de DNA, para lo cual se constató que el patrón obtenido de una muestra de DNA en la RAP-PCR era muy distinto de los obtenidos con las muestras de RNA (tal como se indica en la figura 2.4). Por otro lado, se comprobó que ninguna de las bandas que posteriormente se seleccionaron se correspondía con los genes de que procedían los cebadores arbitrarios utilizados (que correspondían a secuencias de la región codificante de p53 y VEGF). Ello se realizó mediante hibridación de la membrana obtenida de la transferencia de cada uno de los experimentos de RAP-PCR, con una sonda específica de cDNA de los genes mencionados (resultados no mostrados). Por último se comprobó que la pareja de cebadores empleados no influía en el número de genes que podían detectarse por su diferente expresión (resultados no mostrados).

Una de las dificultades en la interpretación de las diferencias entre las variantes celulares analizadas reside en la naturaleza del propio RAP-PCR. Puesto que en la electroforesis hay una separación de los cDNA basada únicamente en su tamaño, es posible que, cuando se recorta una banda, se esté seleccionando más de un cDNA (de hecho, todos los que tengan el mismo tamaño). Cuando después se clona el supuesto producto único en un plásmido, y se obtiene una serie de colonias que han incorporado inserto, en realidad se tiene una representación de todos los insertos posibles. En el presente trabajo, siempre se ha seleccionado un mínimo de tres colonias y se han secuenciado los respectivos insertos.

En realidad, las imágenes electroforéticas en el método RAP-PCR (y por tanto las diferencias observadas) son el sumatorio de todos los cDNAs presentes en cada una de las bandas. La coincidencia de resultados con el análisis Northern posterior es tanto más probable cuantos menos cDNAs haya, y también cuanto más acentuadas sean las diferencias entre las variantes celulares analizadas en la intensidad de un cDNA concreto (puesto que bien puede ocurrir que el solape de las intensidades de dos cDNAs amortigüe las diferencias).

El número total de bandas con una intensidad o presencia diferente que pudieron observarse entre los carriles, fue superior a 50 entre las RAP-PCR de cada uno de los dos

modelos (MXT y MDA MB-435) utilizando los cebadores indicados. En el caso del RAP de las variantes de MXT que presentamos en este trabajo, se seleccionaron y recortaron 18 bandas, tal como se indica en la tabla 2.1, sobre la base de las diferencias entre la línea parental y los 18 clones o variantes metastásicas. La incidencia de los cambios de intensidad para cada una de las bandas sugiere una posible susceptibilidad a los cambios de expresión de los correspondientes genes. Por otra parte, asociando el comportamiento metastásico de las variantes, los resultados de la tabla sugieren las posibles implicaciones de los genes amplificados en la progresión tumoral y en el fenotipo metastásico, o por el contrario, la especificidad de la respuesta hormonal. En este último caso, por ejemplo, las bandas 2MXT, 4bMXT, 5bMXT y 6MXT son indetectables en la línea parental y en la mayoría de los clones o variantes, y aparecen únicamente en E2, que es la que mantiene la respuesta hormonal. Por el contrario, las bandas 5MXT, 8MXT, 12MXT, 14MXT, 15MXT o 16MXT presentan cambios de intensidad (generalmente reducción) en la mayoría de los clones y variantes. La observación de los cambios de expresión en las variantes metastásicas B2 y C1.1 permite resaltar que en la mayoría de las bandas se dan reducciones de intensidad (solo hay un incremento en la banda 5bMXT, en B2), que fueron coincidentes en el caso de las bandas 15MXT y 16MXT, además de la 7MXT. Esta observación resulta interesante por la posible asociación con los “genes supresores de metástasis” caracterizados previamente por pérdida de expresión en poblaciones metastásicas (43). El análisis Northern / slot fue resolutivo en dos bandas del modelo MXT: 7MXT y 16MXT, lo cual permitió confirmar la pérdida de expresión de los genes correspondientes en las variantes metastásicas. En el presente trabajo solo se muestra una representación de los análisis Northern cuyos resultados fueron concluyentes en cuanto a confirmar la expresión diferencial de los transcritos entre las variantes de cada uno de los modelos. Los resultados fallidos correspondían a la incapacidad de la sonda para detectar transcritos específicos en las condiciones utilizadas (esto ocurrió en un 16% de las sondas empleadas, como es el caso de las 4bMXT, 8MXT y 12MXT) o bien a la disparidad de los resultados de Northern con respecto a los de RAP-PCR.

El análisis de la intensidad de las bandas obtenidas en el modelo MDA-MB-435, fue realizado paralelamente al de MXT, utilizando en este caso un amplio número de clones obtenidos por dilución límite de la línea parental y de las variantes metastásicas seleccionadas *in vivo* por su capacidad de producir metástasis en órganos concretos (pulmón, cerebro, hígado...). En la tabla 2.2 se indican las variaciones de intensidad de algunas de las bandas seleccionadas y recortadas, procedentes de uno de los experimentos de RAP-PCR. En este caso, las variaciones en la intensidad de cada una de las bandas en el repertorio de clones y variantes, es muy inferior al que observamos en el caso de MXT. La mayoría de las bandas presentan una intensidad similar y la misma tendencia a aumentar o disminuir con respecto a la línea parental, en todo el repertorio de variantes y clones

analizado. Por ejemplo, la banda 2MDA aumenta su intensidad en todos los casos, mientras que la 6MDA disminuye en todos.

Las bandas MDA utilizadas como sonda en las hibridaciones slot / Northern permitieron reconocer transcritos específicos en todos los casos excepto en 1MDA, en las condiciones experimentales utilizadas. Las bandas 2MDA, 5MDA y 6MDA se sobreexpresan en la variante 435-Lung2 que *in vivo* desarrolla metástasis espontáneas en pulmón. Asimismo, los tres transcritos detectados con la banda 4MDA también se encuentran sobreexpresados en estas células. Por el contrario, la banda 8MDA (Figura 2.4) dio lugar a un transcrito casi indetectable en las células 435-Lung2 mientras que la señal en 435-Brain1 aparece claramente aumentada. No se observaron diferencias de intensidad en el resto de bandas de este RAP-PCR utilizando los cebadores mencionados.

En conclusión, el presente trabajo se centró en las bandas:

7MXT y 16MXT del modelo MXT

2MDA, 3MDA, 4MDA, 5MDA, 6MDA, 7MDA y 8MDA del modelo MDA-MB-435, por su expresión diferencial en las variantes metastásicas.

En consecuencia, se procedió a continuación a identificar los genes correspondientes.

5.2.- IDENTIFICACIÓN DE GENES POSIBLEMENTE ASOCIADOS AL FENOTIPO METASTÁSICO

La identificación de los genes correspondientes a las bandas de RAP-PCR seleccionadas por la expresión diferencial de sus transcritos en las variantes metastásicas y no metastásicas, se detalla en la tabla 5.1.

Banda de cDNA	Homología (identificación del GenBank)	Expresión en variantes metastásicas	especie
7MXT	gi18477347/ emb AL596130.13 Secuencia de DNA de ratón en el cromosoma 11 (del clon RP23-209O5)	Muy disminuida	ratón
16MXT	gi12805580 / gb B002270.1 mRNA de ratón similar al de la enzima E2 (variante 1) que se conjuga con ubiquitina (clon MGC:7660 IMAGE:3496088) (1715 pb)	Disminuida en c1.1	ratón
2MDA	HUMENOA: mRNA de la enolasa humana (1755pb) HUMCMYCQ: mRNA humano de MBP-1 (c-myc binding protein) (1416 pb)	Sobreexpresada (2,15 veces en 435-Lung2)	humana
3MDA	dbjAK000261: mRNA de la proteína hipotética humana FLJ20254 (2174 pb)	Ligeramente disminuida	humana
4MDA	AF387547: mRNA de la proteína humana de células musculares lisas y endoteliales, similar a la neuropilina (ESDN) (2939 pb)	Sobreexpresada (>2 veces en 435-Lung2 y 435-Br1)	humana
5MDA	dbjAK001692: mRNA de la proteína hipotética humana FLJ10830 (2643 pb)	Sobreexpresada (2 veces en 435-Lung2)	humana
6MDA	HUMAHCY: mRNA de la S-adenosil-homocisteína hidrolasa humana (2211 pb)	Sobreexpresada (2,27 veces en 435-Lung2)	humana
7MDA	NM_006614.1: mRNA de una CAM (cell adhesion molecule) humana con homología con L1CAM : <i>close homologue of L1</i>(CHL1(7642 pb)	Sobreexpresada (2 veces en 435-Lung2)	humana
8MDA	HUMMHHLADP: mRNA de la cadena β del antígeno linfocitario humano del MHC clase II (HLA-DP) (1501 pb)	Muy disminuida en 435-Lung2	humana

Tabla 5.1.- Resumen de los genes identificados y de la relación de su expresión con respecto a la de la línea parental (S, en el caso de MXT, y P en el caso de MDA MB-435). Se indica "sobreexpresión" cuando la relación es superior a 1,5, y la disminución supone que la relación es del orden de 0,5 o inferior.

La pérdida de expresión en las variantes metastásicas del gen murino hasta ahora no identificado (denominado en este trabajo como 7MXT), hizo que se plantease su posible aislamiento como candidato a gen supresor de metástasis en este modelo. Con este objetivo, se procedió al cribado de una genoteca de cDNA utilizando como sonda la banda obtenida del RAP-PCR, como única herramienta disponible. Los resultados de este cribado

se detallan en la tabla 5.2. Sorprendentemente, no fue un cDNA único el que se obtuvo sino siete, que correspondían a genes distintos no relacionados entre sí. En la tabla, se indica la expresión de estos genes en relación al comportamiento metastásico *in vivo*.

Clon	Homología (identificación del GenBank)	Expresión en variantes metastásicas
121	AF307844: Mus musculus epithelial protein lost in neoplasm-a (Eplin-a) mRNA, (3997 nt)	Aumentada (2 veces en C1.1)
623	S47577: moesin homolog [mice, teratocarcinoma F9 cells, mRNA, 3835 nt]	Aumentada (2 veces en B2 y C1.1)
4312	OCU21157: Mus musculus sarcolemma associated protein (SImap), mRNA (3288 nt)	Aumentada (más de 2 veces en C1.1)
1111	AB033615: Mus musculus mRNA for phospholipase C-L2 (4185 nt)	
1112	MMU33005: Mus musculus tre-2/USP6, BUB2, cdc16 domain family, member 1 (Tbc1d1), mRNA (4039pb)	Disminuida a menos de la mitad en C1.1
1151	S64860: NonO=non-POU domain-containing octamer-binding protein [mice, B-cell leukemia, BCL1 , mRNA, 2411 nt]	Ligeramente disminuida en B2 y C1.1
3121	MUSEFTU: Mus musculus protein synthesis elongation factor Tu (eEF-Tu, eEf-1-alpha) mRNA (1722 nt)	Similar a la línea parental en B2, ligeramente aumentada en C1.1

Tabla 5.2.- Genes identificados tras los cribados de la genoteca S15 con las sondas de 7MXT y relación de su expresión con respecto a la de la línea parental (S). Se indica aumento cuando la expresión es al menos 1,5 veces la de S, y disminución cuando es como máximo de 0,5 la de S. En el caso del clon 1111 no se pudo hacer el análisis Northern.

Por otro lado, teniendo en cuenta las diferencias de expresión del en principio denominado “gen X” (posteriormente Eplin) en el conjunto de las variantes celulares analizadas, y dado que el fragmento de cDNA identificado era un gen desconocido que aparecía recombinado con el gen de un factor de transcripción (SREBP-2), modificando la actuación de este último, se consideró que podía ser interesante tratar de identificar el “gen X” y establecer su posible influencia (por sí mismo o recombinado con otros genes) en la capacidad metastásica de las variantes celulares que se estaban estudiando.

Para ello, se realizó un nuevo cribado de la genoteca de cDNA de S15, pero utilizando esta vez como sonda el fragmento de cDNA correspondiente a “gen X”. Puesto que en este proceso se obtuvieron virus con insertos de cDNA más o menos completos (entre 2 y 4 kb), se secuenciaron sólo parcialmente por ambos extremos para determinar de qué genes se trataba. Tras la consulta en el GenBank, se identificó una nueva serie de genes, que en algunos casos parecían a su vez estar recombinados entre sí. Algunas de las

combinaciones se obtuvieron en más de una ocasión, lo que podría indicar una cierta frecuencia entre los transcritos representados en la genoteca.

Los casos encontrados se detallan a continuación:

clon	Homología (código de GenBank)
1111	NM_007952.1: Mus musculus endoplasmic reticulum protein (Erp)
	MUSHEPGFA: Mouse hepatocyte growth factor-like protein
1131	NM_005872.1: Homo sapiens breast carcinoma amplified sequence 2 (BCAS2)
1132	AF307845: Mus musculus epithelial protein lost in neoplasm-a (Eplin)
	Similar to hypothetical gene LOC150274
1311	AF209906: Mus musculus receptor (calcitonin) activity modifying protein 2(Ramp2)
	-
1421	AF291064: Mus musculus Stat3-interacting protein
1422	BC004708.1: Mus musculus general transcription factor III C 1, mRNA
	NM_021448.1: Mus musculus signal transducer and activator of transcription 3 interacting protein 1 (Stat3ip1-pending)
1431	D83999: Mus musculus mRNA for the third largest RNA polymerase II subunit
	NM_009090.1: Mus musculus RNA polymerase II 3 (Rpo2-3)
1441	D67076: Mouse mRNA for secretory protein containing thrombospondin motifs (ADAMTS1)
	AB001735: Mus musculus DNA for ADAMTS1

No se incluyen expresiones relativas porque en estos casos no se hicieron análisis Northern, salvo en el de ADAMTS1, en que se encontró una expresión muy aumentada en las variantes metastásicas B2 y C1.1. Por este motivo, se decidió estudiarlo más detalladamente (discusión en el apartado 5.4).

En resumen, de la serie de cDNAs secuenciados a partir de los fragmentos seleccionados en el RAP-PCR, así como de los obtenidos tras el cribado de la genoteca, se ha podido identificar su homología con diversos genes, cuyas funciones son variadas y se muestran conjuntamente en el gráfico de la **figura 5.1**. Se han agrupado en genes del **metabolismo celular**, como el de la enolasa; genes que intervienen en la **regulación de la**

expresión génica, como factores de transcripción o de elongación; genes presuntamente implicados en los procesos de **angiogénesis, diferenciación e invasión**, como moléculas de adhesión; genes que pueden regular el proceso de **proliferación celular**, como bcl-1; y, por último, **genes nuevos**, de función todavía desconocida, como BCAS2 o tbc1d1, o asociados a una proteína todavía hipotética.

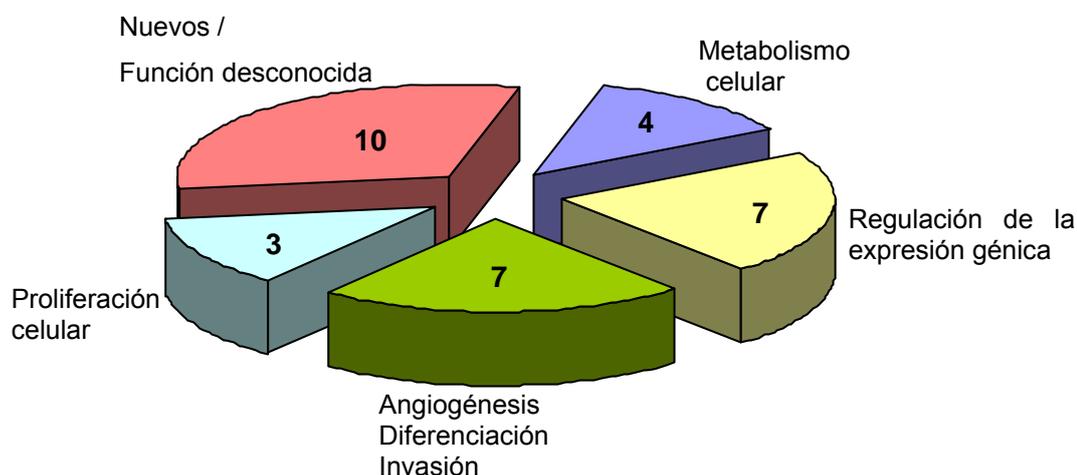


Figura 5.1.- Distribución por grupos de funciones de los genes identificados mediante RAP-PCR y cribado de la genoteca de cDNA. Los números expresan la cantidad de genes identificados adscritos a cada grupo de funciones. Debido a la variedad de funciones que se atribuye a algunos genes, se han adscrito algunos (como el de la enolasa) a dos grupos distintos.

Con posterioridad a la realización de los trabajos de la presente tesis, se enviaron a Affimetrix muestras de RNA de B2 y C1.1 (junto con S, como línea celular de referencia). Se trataba concretamente de 15 µg de cRNA fragmentado procedente del cultivo *in vitro* de las distintas variantes de MXT. El cRNA se había obtenido a partir de cDNA mediante transcripción *in vitro*, y se había marcado con biotina con el objetivo de utilizarlo como sonda en los *arrays* de oligonucleótidos de elevada densidad de Affimetrix. Estos *arrays* consisten en secuencias cortas de 20 a 25 oligonucleótidos correspondientes a 39.000 secuencias transcritas de 34.000 genes distintos (Tipo Genechip: *Mouse Expression Array 430A*, Lote:3003431).

Con estas secuencias de los *arrays* se hibridaron los distintos cRNAs, y se determinaron diferencias entre las expresiones de muchos genes entre los tres clones (algo similar a lo que se ha hecho en el presente trabajo con el método RAP-PCR, pero a gran escala). Del conjunto de genes que se han encontrado en el cribado realizado en el presente trabajo, no todos estaban presentes en los *arrays* de Affimetrix. Por otro lado, como ya ha quedado expuesto, en el presente trabajo no se ha hecho el análisis Northern de todos los genes que se encontraron en los cribados de la genoteca. Por tanto, los resultados que se muestran en la **Tabla 5.3** son parciales, ya que se han incluido solamente los genes de los cuales se tiene información sobre expresión relativa a la línea parental S, tanto de los *arrays*

como de la presente tesis. Los genes que no aparecen, o no estaban presentes en los arrays de Affimetrix, o bien no se ha hecho análisis Northern de ellos en la presente tesis.

En la tabla se muestran las relaciones entre la señal correspondiente a la línea S y la de cada uno de los clones metastásicos (B2 y C1.1), tanto las calculadas a partir de los valores de las señales en los *arrays*, como las que se han calculado en el presente trabajo a partir de análisis Northern, con la intención de cotejar los resultados.

Como puede observarse, se ha encontrado una cierta coincidencia (entre RAP-PCR y *arrays*) en cuanto a las expresiones relativas a S de cuatro genes en las variantes metastásicas B2 y C1.1. En todos los casos que se presentan en la tabla, el sentido de la variación de la expresión (aumento o disminución) es el mismo. Además, es de destacar la notable coincidencia numérica en el caso de B2, teniendo en cuenta las diferencias metodológicas entre las dos técnicas.

En resumen, los resultados obtenidos del análisis de *arrays* apoyan la posible asociación de estos genes con la aparición del fenotipo metastásico, que ya se había deducido a la vista de los resultados de la presente tesis.

Gen	Análisis Northern		Arrays	
	B2	C1.1	B2	C1.1
Eplin	1,38	2,05	1,22	1,01
Moesina	2,02	1,97	2,03	1,22
Tbc1d1	1,01	0,20	1,06	0,47
ADAMTS1	9,78	4,49	1,23	2,12

Tabla 5.3.- Comparación de las expresiones relativas a S obtenidas por análisis Northern y por análisis de arrays. En ambos casos, las cifras que se muestran se calculan dividiendo la señal de la variante metastásica por la señal de la línea parental de referencia, S.

5.3.- CARACTERÍSTICAS DE LOS GENES IDENTIFICADOS Y SU POSIBLE RELACIÓN CON EL FENOTIPO METASTÁSICO

Se detallan a continuación algunas características de los genes identificados, en el caso de que ya se hayan descrito, y se discuten las diferencias en la expresión génica observadas tras un análisis Northern con respecto a su posible contribución a la distinta capacidad metastásica de las variantes.

El gen de la enolasa incrementa su expresión en las células metastásicas (banda 2MDA). La enolasa es una enzima que interviene en la glicólisis catalizando la deshidratación del 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato. En principio, las enzimas del metabolismo anaerobio se encuentran expresadas en todas las células de manera constitutiva; de hecho, se suele utilizar la expresión de mRNA de una de ellas (la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa o GAPDH) como patrón para valorar la expresión de otros genes. Sin embargo, también se ha publicado que en las células tumorales se sobreexpresan los genes de muchas de estas enzimas (145), lo cual es coherente con el aumento de las necesidades energéticas debidas al crecimiento tumoral, que a menudo tiene lugar en condiciones de escasa irrigación inicial (es decir, de poca oxigenación).

Ahora bien, en la última década se han atribuido a la enolasa otras funciones distintas a las relacionadas con el metabolismo energético, y se ha demostrado que puede actuar como receptor del plasminógeno y, en consecuencia, de la enzima activa, la plasmina (146). La enolasa representa a un nuevo grupo de proteínas con lisinas en la región carboxiterminal, que pueden actuar como lugares específicos de unión al plasminógeno. Hoy por hoy, se desconoce el mecanismo por el cual esta molécula es transportada a la superficie celular; pero está demostrado que, una vez en la superficie de células hematopoyéticas, de células endoteliales y de algunas epiteliales, la enolasa actúa como receptor del plasminógeno, y concentra la actividad proteolítica en la membrana celular. Por tanto, la célula adquiere las propiedades proteolíticas y degradativas que le confiere la plasmina, cuya función es degradar a la mayoría de los componentes de la membrana basal y permitir así la migración celular a su través.

En el presente trabajo, las diferencias encontradas en la variante 435-Lung2, en que la expresión de enolasa es más del doble de la correspondiente a la línea parental, podrían relacionarse con la mayor capacidad invasiva, migratoria y metastásica de esta variante. Existen resultados similares en publicaciones recientes sobre tumores de cabeza y cuello en los que la sobreexpresión de enolasa, junto con otros receptores del plasminógeno, como la anexina I, se correlacionan con la invasión y metástasis (147).

La expresión de ESDN (endothelial and smooth muscle cell-derived neuropilin-like protein), también denominado CLCP1 (CUB, LCCL, coagulation factor V/VIII-homology domains protein 1) (banda 4MDA) es elevada en las células más metastásicas. La estructura de la proteína ESDN / CLCP1 consta de una larga secuencia señal de secreción, una región CUB (C1r/C1s, uEGF, Bmp1), una zona de homología con los factores de

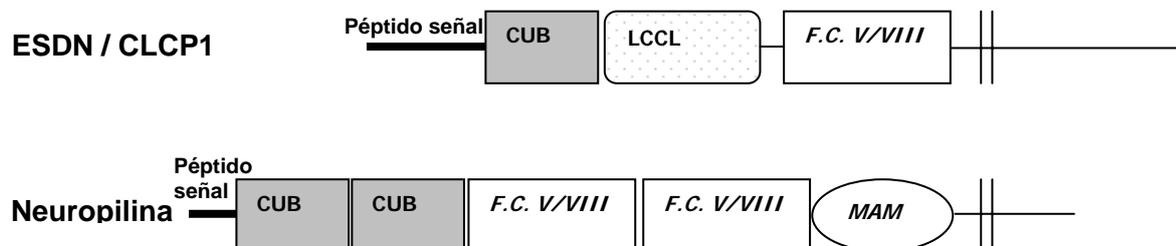


Figura 5.2.- Esquema comparativo de la estructura molecular de la ESDN/CLCP1 y las neuropilinas. Las regiones CUB (secuencia encontrada por primera vez en C1r, C1s, uEGF y en la proteína ósea morfogénica, Bmp1) y la similar a los factores de coagulación V y VIII, que son las comunes a ESDN y neuropilinas, se encuentran también en otras proteínas, y suelen intervenir en interacciones entre proteínas.

coagulación V y VIII, y una región con el denominado módulo LCCL (*Limulus clotting factor C, Coch-5b2 and Lgl1*). La región CUB forma parte de diversas proteínas extracelulares o de superficie, algunas de ellas implicadas en la proliferación vascular, como PDGF-C, o la propia neuropilina). El módulo LCCL suele encontrarse asociado a otras regiones modulares, y podría tener una función en la conservación de la estructura de la proteína o en su capacidad de unión a otras moléculas (148). En el contexto del estudio de la metástasis, lo más interesante es quizá, el parecido estructural entre ESDN / CLCP1 y las neuropilinas, como se observa en la **figura 5.2**.

Las neuropilinas constituyen una pequeña familia de glicoproteínas. La neuropilina-1 (NRP-1) es la que se representa en la **figura 5.2**, y tiene una corta región intracitoplásmica. Además, también hay una isoforma soluble de 90 kD de la NRP1 (denominada sNRP1), que contiene sólo las partes extracelulares, y una neuropilina-2 (NRP-2), que presenta una gran homología con NRP-1.

Las neuropilinas actúan como receptores de las semaforinas secretadas de clase 3, de diferentes isoformas del VEGF (*vascular endothelial growth factor*): VEGF₁₆₅, VEGF-B y VEGF-E, y del factor de crecimiento placentario (PIGF). Los incrementos de expresión de VEGF se han relacionado con la neoangiogénesis en diversos tipos de tumores como el de mama (149) y melanoma (150), y, en consecuencia, con la agresividad del tumor. La unión de VEGF a receptores con actividad tirosin-quinasa (VEGFR-1 y VEGFR-2) implica la activación de diversas rutas de señalización que conducen a la inducción de la síntesis de DNA y de la capacidad migratoria de las células endoteliales de vasos pre-existentes. La

actividad de VEGF está mediada por receptores con actividad tirosin-quinasa (VEGFR-1 y VEGFR-2). NRP1 parece actuar de diversas maneras: 1) cuando VEGFR-2 y NRP1 se encuentran en la misma célula endotelial, VEGF₁₆₅ podría servir de puente de unión entre ambos receptores, y así se potenciaría la actividad de VEGF sobre la célula endotelial; 2) cuando NRP1 se encuentra en una célula tumoral y VEGFR-2 en una endotelial, la acción de VEGF₁₆₅ como puente permite que la célula tumoral y la endotelial permanezcan muy próximas, lo que facilita la actividad de VEGF. Las uniones entre NRP1 y VEGF₁₆₅ se llevan a cabo a través de la zona de NRP1 homóloga a los factores de coagulación V y VIII. (revisión en Miao (151)).

ESDN se obtuvo inicialmente a partir de células endoteliales y se ha encontrado sobreexpresada en ellas después de una lesión vascular (152). Por otro lado, también se ha encontrado una mayor expresión en células tumorales de pulmón *in vivo* y en líneas celulares de tumores pulmonares de gran capacidad metastásica (153). Estos datos, junto con la homología estructural entre ESDN y NRP1, permiten especular sobre la posibilidad de que ESDN realice actividades similares o, al menos, que tenga algún papel durante la progresión metastásica, si bien hasta el momento no se ha podido demostrar.

La sonda 4MDA reconoce diversos transcritos: al menos tres en todas las variantes celulares analizadas, pero en algunos caso cuatro. Como la zona del gen ESDN cuya secuencia es homóloga a la de 4MDA (1318-1708) está comprendida por completo en la parte homóloga a los factores de coagulación V y VIII (1249-1710), podría pensarse que los transcritos observados son de genes, conocidos o no, que contienen este tipo de secuencia, lo cual no excluye a las propias neuropilinas. En el trabajo de Koshikawa (153) se incluyen resultados de análisis Northern en que se observan también diversos transcritos (habiendo usado una sonda que abarcaba las regiones CUB y Factor-V/VIII).

Los resultados del análisis Northern con la sonda 4MDA indican una mayor expresión del transcrito de mayor tamaño (4MDA-1) en las dos variantes más metastásicas, 435-Lung2 y 435-Lung-3 (más del doble que en las células parentales, y siete veces mayor que en algunas variantes poco metastásicas, como 435-Brain-2). Los otros transcritos (4MDA-2 y 4MDA-3) también se expresan más en 435-Lung que en las células parentales y en 435-Brain-2, aunque menos del doble.

El gen de la **S-adenosil-homocisteína hidrolasa (SAH-H)** (banda 6MDA) está **sobreexpresado en células muy metastásicas**. La S-adenosil-homocisteína hidrolasa (EC 3.3.1.1) es una enzima que participa en el metabolismo de los aminoácidos. Concretamente, cataliza la hidrólisis de la S-adenosilhomocisteína en adenosina y homocisteína (ver **figura 5.3**). A su vez, la S-adenosilhomocisteína (SAH) se produce por desmetilación de la S-

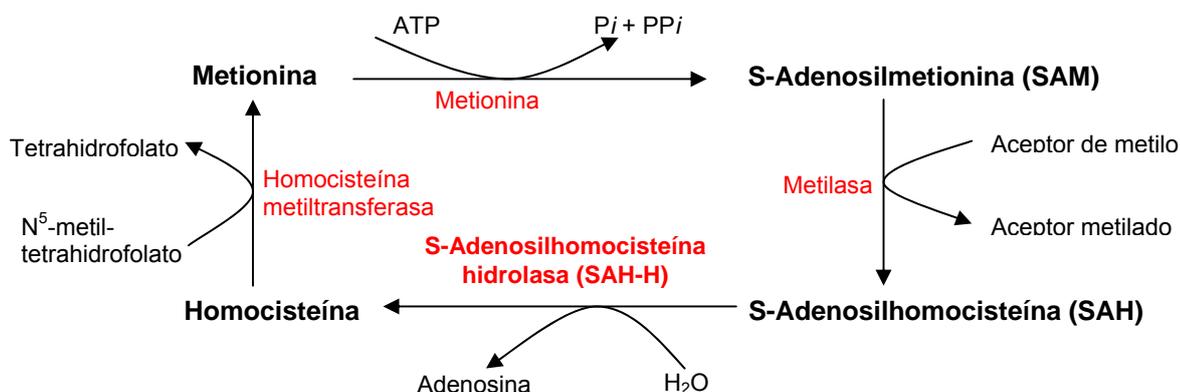


Figura 5.3.- Esquema de la participación de la S-Adosilhomocisteína hidrolasa en el metabolismo de la metionina y la transferencia de grupos metilo entre diferentes compuestos.

adenosilmetionina (SAM), que es un activo e importante agente metilador. Entre los aceptores de metilo se encuentran determinados fosfolípidos como la fosfatidiletanolamina, u hormonas como la noradrenalina; además, todas las metilasas del DNA utilizan a la SAM como dadora de grupos metilo. Por su parte, la SAH es un potente inhibidor endógeno de las reacciones de metilación mediadas por la SAM. Es conocido desde hace tiempo que la inhibición de la SAH-H origina un fenómeno de hipometilación del DNA, y se han probado como antiproliferativos e inductores de la diferenciación celular numerosos inhibidores de esta enzima (como los análogos de la adenosina). De manera inversa, se puede suponer que el hecho de que exista una mayor expresión de la SAH-H acelera el ritmo de metilación implícito en el ciclo metabólico de la metionina. La metilación del DNA, especialmente de las regiones promotoras, inactiva la expresión de genes. Por tanto, podría aventurarse que las diferencias en la expresión de la SAH-H podrían intervenir de manera indirecta en la disminución de la expresión de genes diversos.

En el presente trabajo, se observa un claro aumento de expresión de la SAH-H en el caso de la variante 435-Lung2 de elevada capacidad metastásica: es aproximadamente el doble de la que se da en las células parentales y en las 435-Brain1, de escasa capacidad metastásica. Puesto que se ha observado (datos no presentados en este trabajo (154)) que la inhibición de la DNA-metiltransferasa (es decir, la inhibición de un proceso de metilación) restablece la expresión de "MHC-II" en las células 435-Lung2, en las que está suprimida, sería razonable pensar que existe una asociación entre la mayor expresión de la S-

adenosilhomocisteína hidrolasa y la falta de expresión de “MHC-II”, por la probable mediación de un gen diana desconocido, susceptible de ser metilado, que podría controlar la actividad transcripcional del promotor IV del transactivador CIITA.

Sobreexpresión del gen de la CALL (*cell adhesión L1-like*) (banda 7MDA) en variantes muy metatásicas. Esta proteína es el ortólogo humano de la CHL1 (*close homolog to L1*) murina, un nuevo miembro de la familia L1 de las moléculas de adhesión celular (*L1 cell adhesión molecule*, L1CAM). Las proteínas CAM pertenecen, a su vez, a la denominada superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig). Son glicoproteínas de membrana con diversas regiones homólogas a regiones concretas de las inmunoglobulinas, seguidas de varias repeticiones del tipo III de la fibronectina, y una zona intracitoplásmica, o bien una región de anclaje a la membrana mediante glicofosfatidil-inositol (**figura 5.4**). Las L1CAM constan de seis regiones inmunoglobulínicas y cinco de fibronectina tipo III, además de una corta zona intracitoplásmica. CALL / CHL1, en concreto, consta sólo de cuatro regiones de fibronectina III, y la zona citoplásmica es de 105 aminoácidos.

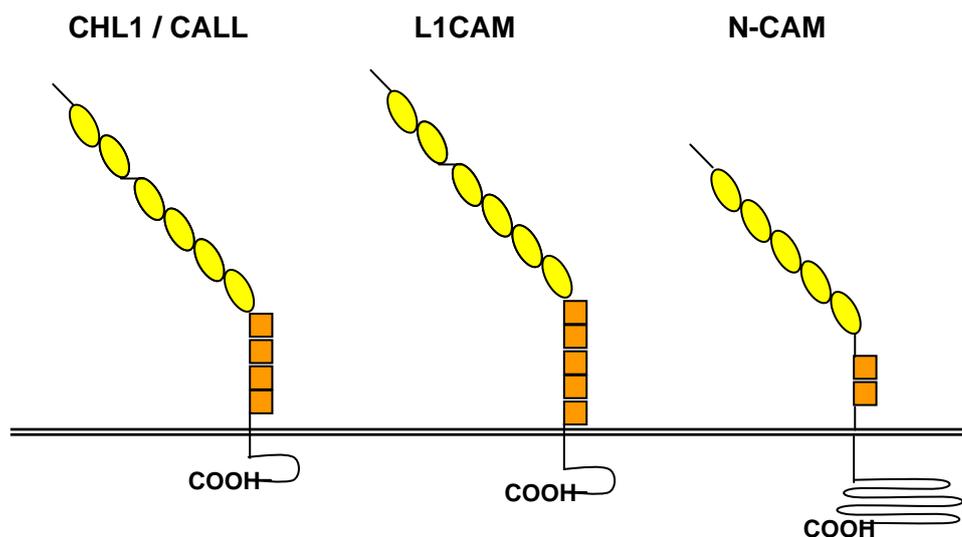


Figura 5.4.- Comparación entre las estructuras de algunas CAM. Las elipses amarillas representan regiones similares a fragmentos de las inmunoglobulinas, que, en número variable, constituyen el extremo aminoterminal de todas las moléculas de la familia CAM, y están implicadas en la interacción entre proteínas. Los cuadrados naranjas representan las repeticiones tipo III de la fibronectina; se encuentran también en número variable en las proteínas CAM, y se ubican en la superficie celular. El extremo carboxiterminal suele ser intracitoplásmico, de longitud también diversa, y probablemente interviene en procesos de señalización.

Las CAM, en su mayoría, son proteínas de la superficie celular que reconocen a otras proteínas de la superfamilia Ig, tanto solubles como asociadas a otras células. Esta interacción con otras proteínas de membrana permite que intervengan en la adhesión intercelular. Por otro lado, gracias a su región intracitoplásmica, también intervienen en la transmisión de señales, entre ellas las que regulan la diferenciación y la proliferación. Por

tanto, mediante su función de unión entre las células, las CAM permiten el intercambio de información mediado por otros componentes celulares.

Hasta ahora existen pocos estudios sobre CALL: su descubrimiento se produjo en un trabajo sobre el retraso mental en pacientes con el síndrome de la deleción 3p (155), y tanto CALL como CHL1 parecen haberse estudiado sólo en el ámbito de la neurología (156,157) donde se ha observado su importancia en la regeneración de neuronas en nervios lesionados (158).

No hay ningún estudio sobre la posible relación de CALL / CHL1 con el cáncer; por eso cobra especial interés su patrón de expresión diferencial observado en el análisis Northern del presente trabajo. La homología de la sonda 7MDA se da entre los nucleótidos 2308 y 2561 de CALL, zona que se corresponde con parte de dos regiones de fibronectina III; a pesar de ser una zona común con otras moléculas de la familia, no se detectan más que dos transcritos, cosa que ya se había observado previamente (155), y que hace sospechar una especificidad suficiente como para pensar que pueda deberse a una maduración alternativa. La expresión de CALL en la variante más metastásica (435-Lung2) es aproximadamente el doble que en la línea parental y casi cuatro veces superior a la de algunas variantes poco metastásicas como 435-Brain2. Esto es lo contrario de lo que parece ocurrir en el caso de N-CAM, cuya pérdida de expresión se ha relacionado con la progresión metastásica, ya que N-CAM favorece la adhesión de las células tumorales a la matriz (159). Por tanto, CALL/CHL1 podría tener alguna otra función distinta de la adhesión que explique su aumento de expresión en las células más metastásicas.

Perdida de expresión del gen de la cadena β de HLA-DP (*Human MHC class II lymphocyte antigen*) en células metastásicas. Las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) se denominan HLA en el caso de los humanos. Las de la región II (MHC-II) son glucoproteínas heterodiméricas de superficie especializadas en la presentación de antígenos peptídicos a los linfocitos T colaboradores (*helper*) CD4+. Los genes de las cadenas α y β de que constan se encuentran en las subregiones DP, DQ y DR (de ahí que los diferentes isotipos de las proteínas se denominen HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR) y se expresan en las células dendríticas, los linfocitos B, los macrófagos y algunos epitelios. Estos genes se encuentran, en general, corregulados, y su expresión es inducida por la exposición a diversos agentes, como el interferon- γ . La expresión de las moléculas MHC-II está controlada en primer lugar en el proceso de transcripción. El conocimiento actual de la regulación de la transcripción de los genes del MHC-II procede del estudio de las alteraciones debidas al defecto de MHC-II (132). Estos estudios han conducido a la identificación de CIITA y RFX, dos transactivadores esenciales para la expresión de MHC-II (133). Mientras que RFX y otros factores de transcripción se expresan ubicuamente, CIITA se expresa diferencialmente siguiendo un patrón correlacionado con el de las moléculas del

MHC-II (134,135). Se cree que CIITA funciona como coactivador transcripcional, que interactúa con factores unidos a los promotores de MHC-II (136).

En el presente trabajo se ha demostrado la correlación entre el nivel de expresión de los genes de MHC-II (representado por la expresión observada para 8MDA), con los niveles de mRNA de CIITA. En ambos casos, la expresión se encontró significativamente disminuida en la variante más metastásica (435-Lung2).

Es probable que los cambios en la expresión de las moléculas MHC-II puedan influir significativamente en el escape de las células tumorales de la vigilancia inmunológica, lo que facilita la metástasis (160). Se ha descrito una expresión alterada de MHC-II en los melanomas (161), hepatocarcinomas (162), y en los carcinomas colorrectal (163) y laríngeo (164). La elucidación de los mecanismos que regulan la expresión de las moléculas MHC-II en los tumores, y en especial en las células muy metastásicas, representa un importante desafío para la biología de las metástasis.

La expresión del gen de ratón similar al de la enzima E2 (variante 1) que se conjuga con la ubiquitina (banda 16MXT) está disminuida en células metastásicas. La ubiquitina es una proteína abundante, ubicua (se encuentra en todos los eucariotas) y muy conservada a lo largo de la evolución. Sirve como señalizadora de las proteínas que habrán de ser degradadas por la célula, lo cual hace que intervenga en procesos tan variados como el control del ciclo celular, la reparación del DNA o las respuestas inflamatorias (aunque en los últimos años se ha estudiado también su papel en otros procesos como la endocitosis o la transducción de señales). La ubiquitina realiza su función mediante la interacción en diversos pasos con ciertas enzimas (E1, E2 y E3). Existen distintas variantes de las enzimas E2 y E3, y se cree que la especificidad de la ubiquitina por una determinada proteína diana se debe a las diferentes combinaciones entre ellas, así como a otros factores auxiliares (165). Las variantes de E2 comparten una región catalítica común de unos 150 aminoácidos, y se clasifican según la extensión de sus regiones carboxiterminales o aminoterminales. Pero también existen variantes atípicas (denominadas ubiquitin-conjugating enzyme variants, UEV), de secuencia similar a E2 pero sin su actividad enzimática (166). En humanos, hay al menos dos genes con información para UEV, con diversas isoformas derivadas de una maduración alternativa. Se ha propuesto que las UEV participan en el control de la diferenciación alterando el ciclo celular por inhibición de la quinasa cdk1 (166). Por otro lado, al menos alguna de las variantes tiene la capacidad de activar la transcripción de c-fos. Por último, también se ha propuesto que estas proteínas podrían tener un papel en la protección frente a las lesiones del DNA (167).

El gen correspondiente a la banda 16MXT parece ser una variante todavía no estudiada del conjunto de las E2. La banda 16 MXT se corresponde con la zona no traducida (3'-UTR) del mRNA; al utilizarla como sonda en un análisis Northern, se han

detectado dos transcritos, lo que también podría atribuirse a un fenómeno de maduración alternativa. Se ha observado una menor expresión en las variantes celulares más metastásicas. En concreto, el transcrito mayor presenta aproximadamente la mitad de expresión en E2 que en las células parentales (S), mientras que el transcrito menor se expresa la mitad en C1.1 con respecto a S.

La expresión de 7MXT está disminuida en las variantes más metastásicas. En el caso de la banda **7MXT**, las diferencias de expresión observadas entre las distintas variantes es notable; en especial, resalta la escasa expresión en las variantes con más capacidad metastásica (C1.1), mientras que la expresión es unas ocho veces más intensa en la variante E2, poco metastásica. Estas características hacían interesante el conocimiento del gen del que procedía el fragmento (cDNA) 7MXT. Tras la clonación y secuenciación de este fragmento, se comprobó que no existía ninguna homología con los genes conocidos en los bancos de datos GeneBank o CDS de Celera. Sin embargo, en los últimos meses se ha podido localizarlo, como integrante de una secuencia (*DNA contig*) del cromosoma 11 murino, en la región 11C, que es una zona intergénica, es decir, situada entre genes distintos ya identificados. Dicha región corresponde en humanos a la región **17q21-q23**, donde se localizan genes supresores de metástasis. De hecho, en la década de los 90 se identificaron varias regiones discontinúas del **cromosoma 17 humano** (DS17S952→D17S805, D17S930→D17S797 y D17S944→qter) que, introducidas en células metastásicas mediante técnicas de MMCT (*Microcell Mediated Chromosome Transfer*), eran capaces de suprimir el fenotipo metastásico (28).

Mediante análisis de Southern Blot y PCR, se demostró que tres de cuatro marcadores localizados en la región 17p13 –entre ellos HIC1 y p53-, así como 12 de los 13 marcadores de la región **17q21-23** –entre ellos BRCA1 y el gen supresor de metástasis nm23-, no se encuentran en las células metastásicas. La veracidad de esta información fue comprobada mediante estudios paralelos con células híbridas (obtenidas mediante fusión de células metastásicas y no metastásicas), que mantenían estas regiones del cromosoma 17 y que cuando eran implantadas en animales de experimentación reducían el número de metástasis pulmonares entre 15 y 30 veces con respecto a la línea metastásica parental. Esta reducción de la capacidad metastásica podría ser el resultado de la inhibición o abrogación de alguna de las etapas del proceso metastásico, y podría deberse a la reposición de alguno de los genes contenidos en esta región, que directamente recuperara su expresión y función represora, o bien que afectara a algún otro gen (por ejemplo a factores de transcripción específicos) que a su vez regulara la expresión de genes contenidos en otros cromosomas. Esta última posibilidad ha sido evidenciada en modelos experimentales de melanoma humano, en los que la transferencia del cromosoma 6 -concretamente la región cromosómica 6q16.3-q23, de 40 Mb-, es capaz de suprimir la

capacidad metastásica en el pulmón debido a que contiene un elemento de *transactivación* que regula la expresión de un gen localizado en el cromosoma 1, denominado KISS 1 (35).

Aparte de los resultados obtenidos por análisis Northern, en que se confirmaba la escasa expresión del hipotético gen **7MXT** en las variantes metastásicas mientras que era superior en las no-metastásicas, los estudios preliminares con 7MXT en otros tipos de tumores como los del modelo tumoral de piel de ratón (carcinoma escamoso) HaCa-4, de carcinoma colorectal c26 u otros tumores murinos, indican la pérdida de expresión en líneas metastásicas mientras que la expresión se mantiene en las tumorigénicas que no son metastásicas (resultados no mostrados). Esto sugiere la hipótesis de que podría tratarse de **un gen supresor de metástasis**.

Por otro lado, la expresión de 7MXT sólo se ha probado en algunos órganos de ratón adulto, como ovario y bazo (no había expresión, por ejemplo, en músculo, pulmón o riñón), mientras que se daba en todos los órganos fetales analizados (músculo, pulmón, riñón; pero sobre todo corazón y bazo). Aunque no se ha podido demostrar, es de prever que también exista expresión en el ovario de las crías, si bien deberá probarse en el futuro, para determinar si la actividad del gen aumenta con el paso del tiempo, disminuye (como ocurre en el caso del bazo), o se conserva con respecto al período gestacional. Esta comparación se deberá extender a un conjunto más amplio de RNA de diferentes órganos. En cualquier caso, teniendo en cuenta los datos actuales, parece que la actividad del gen es ubicua durante el período gestacional (aunque no homogénea en todos los órganos); y durante el desarrollo, como ocurre con numerosos genes, va variando de manera que llega a desaparecer de muchos órganos, pero se mantiene, como mínimo, en el ovario y el bazo de los ratones adultos. La aparente ubicuidad fetal de su expresión permite relacionar al gen con una función básica, aunque la gran diferencia de expresión entre órganos podría orientar la investigación en el futuro. Por otro lado, puesto que las células tumorales presentan características embrioides, y todos los órganos fetales analizados expresaban el gen, se podría asociar su expresión con un fenotipo tumoral.

Cuando se utilizó el cDNA de la banda 7MXT como sonda para cribar una genoteca de cDNA preparada a partir de la variante S15 (que era la que a priori contenía más mRNA del gen correspondiente a 7MXT) no se pudo aislar el cDNA completo. Esto se debió probablemente a la naturaleza de la secuencia de la banda: contenía motivos repetitivos del tipo B1, muy abundantes en el genoma del ratón, incluso en las zonas exónicas, lo que determinó seguramente que los cDNAs que se identificaron no fuesen específicos. Ahora bien, mediante un análisis Northern se pudo determinar que al menos algunos de estos cDNAs se expresaban de manera diferencial en las distintas variantes celulares estudiadas, y, por tanto, podían considerarse como candidatos a representar algún papel en el proceso metastásico.

Sobreexpresión de Slmap (*sarcolemmal-associated protein, homolog to SLAP3*) **en la variante más metastásica** (C1.1). Slmap es una de las proteínas de ratón asociadas al sarcolema. Se trata de una familia de la que se han estudiado hasta el momento tres proteínas: SLAP1 (37 kD), SLAP2 (46 kD) y SLAP3 (74 kD). SLAP3 parece ubicua, mientras que SLAP1 y SLAP2 se encuentran sobre todo en los músculos cardíaco y liso, y en el sóleo (168). Todas parecen proceder de un mismo gen (SLAP), ubicado en 3p14.3-21.2 (al menos en el conejo, ya que en el ratón se ubica en el cromosoma 14), y los diversos transcritos se generan por maduración alternativa: los exones 4 y 10 se expresan según el tejido y según el momento del desarrollo del organismo. El rasgo más destacable de estas proteínas es su supuesta capacidad para formar una estructura enrollada en casi toda su longitud, y una posible zona transmembranaria en el extremo carboxiterminal. Todavía no se conoce el papel fisiológico de SLAP, pero su estructura comparte algunas características de las proteínas ancladas a membranas por una cola (como sintaxina o epimorfina), y podría intervenir en procesos de la biología membranaria, como la fusión de membranas (169).

En el análisis Northern del presente trabajo, se observa que la expresión de Slmap en la variante más metastásica, C1.1, es más del doble que la de la línea parental (S).

La expresión de eEF-1 α (*eukaryotic elongation factor 1 α*) **está moderadamente aumentada en las variantes más metastásicas**. Se trata de un monómero del factor de elongación de la síntesis de proteínas. El factor de elongación eEF-1 es una proteína multimérica que se encarga de combinarse con un aminoacil-tRNA para llevarlo al ribosoma, de manera que el aminoácido pueda incorporarse a la cadena proteínica en crecimiento. En este proceso se gasta una molécula de GTP. Debido a su función, el factor eEF-1 es una proteína muy abundante en las células (en *E.coli* es la mayoritaria). Pero últimamente se ha propuesto que podría intervenir en otros procesos (170). En las levaduras, la sobreexpresión de eEF-1 α tiene efectos en el crecimiento celular, pero no por su intervención en la síntesis de proteínas, sino por su papel en la gemación (hace que disminuya) y la morfología celular (se altera la distribución de la actina). Por tanto, aparte de su posible implicación en la oncogénesis a través de su actividad clásica de factor de elongación (puesto que parece existir una conexión entre la regulación de la síntesis de proteínas y la alteración del comportamiento celular que se da en el cáncer (171), su relación con componentes del citoesqueleto es un aspecto que podría ser interesante con respecto al comportamiento metastásico. En el análisis Northern del presente trabajo, se observaron diferencias en la expresión entre las variantes celulares estudiadas, si bien sólo se apreció una sobreexpresión del 40% en las células más metastásicas (C1.1).

NonO (*non-POU domain-containing octamer-binding protein*) (o p54^{nrb}, *nuclear RNA-binding protein*, en humanos). Gen de una proteína homóloga a la proteína *no-on-*

transient A/dissonance de *Drosophila* (172). Contiene un par de zonas RRM (*RNA recognition motif*), que se encuentran en una gran variedad de proteínas que se unen al RNA. De hecho, p54^{nrb}/NonO presenta gran afinidad por el RNA, pero no se ha observado todavía su implicación directa en la maduración del RNA. Sí se ha demostrado que el complejo de proteínas p54^{nrb}-PSF (*polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor*)-matrina3 actúa como un brazo nuclear que retiene en el núcleo a ciertos RNAs defectuosos (que contienen inosinas en vez de adeninas). Por otro lado, p54^{nrb}/NonO parece intervenir en la modificación de la transcripción de algunos genes, bien por su capacidad de unión al DNA, bien porque induce la acción de otros factores de transcripción. Asimismo, se ha observado que p54^{nrb}/NonO puede potenciar la actividad de la topoisomerasa I (revisión en (173)). Además, es de resaltar la existencia de proteínas de fusión de fragmentos de p54^{nrb}/NonO y TFE3 (un factor de transcripción) en carcinomas de células papilares renales (174). Por último, la p54^{nrb}/NonO tiene actividad de anhidrasa carbónica y podría participar en el mantenimiento del pH nuclear (175). Dada la variedad de funciones en que parece implicada, se ha propuesto que podría servir como conector estructural de la matriz nuclear, pero también presentar actividades que podrían depender tanto de su localización nuclear como de su presencia como monómero o heterodímero junto con PSF (173). En el presente trabajo, no se han detectado notables diferencias de expresión en las variantes de mayor capacidad metastásica con respecto a la línea parental; pero sí se ha observado una expresión cinco veces superior de este mRNA en la variante S13, de escasa capacidad metastásica.

La moesina (*membrane-organizing extensión spike protein*) se sobreexpresa en todas las variantes celulares más metastásicas. En realidad, se ha identificado el gen de una variante de moesina de las células de un teratocarcinoma (176). La moesina es uno de los miembros de la familia ERM, compuesta, además, por ezrina y radixina. Se trata de proteínas cuya mitad aminoterminal es muy similar (con más de un 85% de homología), no sólo entre sí, sino también con otras proteínas submembranarias como la proteína banda 4.1, lo que indica que pertenecen a la superfamilia de esta última. Las proteínas ERM presentan, además, una región de hélice α y un extremo carboxiterminal que les permite unirse a la actina. Estas proteínas tienen como función común básica el servir de unión entre el citoesqueleto de actina y ciertas proteínas de la membrana plasmática como CD44, lo que las convierte en mediadores de señales externas de diversa finalidad: pueden intervenir tanto en procesos de movilización de proteínas por el interior de la célula como en la movilidad de las propias células (por ejemplo, interviniendo en la emisión de filopodios), o en la adhesión de las células a otras células o a la matriz extracelular. En general, se encuentran en las zonas de mayor interactividad del citoesqueleto con la membrana.

Puesto que la función de todas ellas es similar, parece que su coexpresión es una medida de seguridad. Sin embargo, existen diferencias en cuanto a histo especificidad. Por ejemplo, las células del epitelio intestinal sólo expresan ezrina y moesina, los hepatocitos sólo radixina y moesina, y en las plaquetas y en las células endoteliales predomina la expresión de moesina.

En situación inactiva, las proteínas ERM se cierran sobre sí mismas o se asocian a otras proteínas ERM por unión entre sus regiones aminoterminal y carboxiterminal. La GTPasa Rho podría ser la encargada de regular la activación de las ERM y su unión a CD44, pero se desconoce el mecanismo responsable.

La variante de cDNA de la moesina identificada en el presente trabajo tiene una secuencia de unos 200 nucleótidos más en la región 5', y 1500 más en la región 3' no traducida (3'UTR). En total, tiene 3835 nucleótidos, y contiene la codificación para la moesina completa. Mediante análisis Northern, se detecta más del doble de expresión en las variantes celulares más metastásicas, y especialmente en E2, donde la expresión es más del triple de la de la línea parental.

El gen X (posteriormente denominado Eplin) está más expresado en la variante más metastásica. El último de los cDNAs identificados mediante el cribado de la genoteca S15 con la sonda 7MXT fue el que en su momento se denominó **gen X (177)**. Esta secuencia, de 2911 nucleótidos, se había detectado unida al gen de la SREBP-2 (*sterol regulatory element binding protein-2*), un factor de transcripción anclado a la membrana plasmática que, por proteólisis de su zona aminoterminal en condiciones de escasez de colesterol, pasa al núcleo, donde activa a los genes del receptor de LDL (*low density lipoprotein*) y diversas enzimas de la síntesis del colesterol. La unión por recombinación del fragmento denominado "gen X", que sustituía la zona carboxiterminal de la SREBP, era responsable de la activación permanente del factor de transcripción. Este fragmento fue asimilado a una zona intrónica.

Sin embargo, posteriormente se identificó una nueva proteína del citoesqueleto que coincidía en gran parte (alrededor del 85% de la secuencia) con este "gen X" y que se denominó **eplin (epithelial protein lost in neoplasm) (178)**. Existen dos isoformas de EPLIN, que se producen a partir del mismo gen: EPLIN- α (de 593 aminoácidos en el caso del ratón) y EPLIN- β (de 753 aminoácidos en el ratón) (179). El gen se encuentra en el cromosoma 15 del ratón; pero la organización del gen se ha estudiado en humanos: comprende 11 exones, que se transcriben por completo en el caso de eplin- β , y sólo los exones 4 a 11 en el caso de eplin- α . El cDNA completo consta de 3997 nucleótidos y contiene en su parte central una región LIM (lin-11, isl-1, mec-3); la zona correspondiente de la proteína es capaz de unirse a zinc. La expresión de las dos isoformas puede ser regulada independientemente (180). Las primeras observaciones, en humanos, apuntaban a la disminución de la expresión de eplin- α .

en las líneas celulares de cáncer de próstata y mama, mientras que eplin- β se expresaba en mayor cantidad o no cambiaba, con respecto a las células normales. Eplin- α se expresa mucho en los tejidos embrionarios, y en el bazo y el pulmón de los ratones adultos, mientras que eplin- β se expresa sobre todo en riñón, testículos, pulmón e hígado (179). Las EPLIN son proteínas asociadas a las fibras de estrés de la actina y a las placas de adhesión focal mediante su región aminoterminal. Se ha propuesto que participan en el control del crecimiento gracias a su asociación con el citoesqueleto de actina y a la regulación que ejercen sobre él (181).

Cabe considerar que existe una secuencia en el GenBank (si bien no hay, de momento, ningún artículo publicado), identificada como SREBP-3, que se corresponde con una nueva *sterol regulatory element binding protein*, expresada en el hipotálamo humano, y que también presenta una gran homología (85%), justo a partir de la zona codificante, con el cDNA identificado en este trabajo. O lo que es lo mismo, que presenta una homología de más de un 80%, con la secuencia de los eplin.

En el análisis Northern del presente trabajo, se observa una sola banda de mRNA, probablemente porque la diferencia de tamaño entre los mRNAs de eplin- α y eplin- β no es lo bastante grande como para que pueda distinguirse en la membrana que se ha utilizado. La mayor expresión se da en la variante más metastásica, C1.1 (dos veces más que en la línea parental S), mientras que la expresión de E2 y B2, las otras variantes más metastásicas bien sea espontánea o experimentalmente, es también mayor que la de S, aunque no superior a un 40%.

Tbc1d1 (*tre-2/USP6*, **BUB2**, *cdc16 domain family, member 1*) es el gen de una proteína perteneciente a una familia que contiene la secuencia **tbc** (de 180-220 aminoácidos), que muestra homología con el oncogén *tre-2* y los reguladores de la mitosis en levaduras *BUB2* y *cdc16*. Su región aminoterminal es rica en cisteínas e histidinas, que podrían formar parte de un dedo de zinc. TBC1D1 es una proteína nuclear que se expresa mucho en las células hematopoyéticas, los testículos y el riñón (182). Se cree que la familia de proteínas que contienen la secuencia *tbc* puede tener algún papel en la diferenciación y en la regulación del crecimiento celular. El gen *tbc1d1* se encuentra en el cromosoma 5 del ratón (183). La secuencia del cDNA identificado en el presente trabajo sólo coincidía en parte con *tbc1d1*, en concreto desde la mitad de la secuencia de este último hacia 3', que es justamente la zona del cDNA que contiene la región *Tbc*; pero el hecho de que la secuencia del otro extremo (el 5') no se encuentre en el GenBank hace sospechar que el cDNA obtenido tras el cribado no es propiamente de *tbc1d1*, sino de algún otro nuevo miembro de la familia.

La **fosfolipasa C-L(2) (PLC-L(2) o *Phospholipase C-like protein-(2)*)** (184) es una variante de la fosfolipasa C que presenta algunos cambios en aminoácidos, que parecen ser los responsables de su falta de actividad como fosfolipasa. La PLC-L(2) tiene una amplia distribución, pero se expresa principalmente en el músculo esquelético, y se localiza en las áreas perinucleares. Además, la región PH de la proteína se une fuertemente al inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃), y es posible que tenga un papel en la regulación de la unión de esta molécula a su receptor. El gen de la PLC-L(2) se encuentra en 3p24-25.

La tiol-oxidoreductasa **Erp57** (identificada en principio como fosfolipasa C- α y también como GRP58, Erp61, ER60, HIP-70, Q2 y CPT) se ha observado unida, junto con las chaperonas calnexina y calreticulina, a diversas glicoproteínas del retículo endoplásmico recién sintetizadas. Al parecer, Erp57 es un componente del complejo de “carga de péptidos” del MHC clase I, que podría influir en el plegamiento de las moléculas del MHC clase I (185). De hecho, se ha observado que la calnexina o la calreticulina facilitan que Erp57 se ponga en contacto con la glicoproteína CD1, antes de unirse a la β -microglobulina, y se puedan establecer puentes disulfuro en la glicoproteína (186). Previamente, se había observado que existe una forma soluble de Erp57, y que sus actividades redox intracelulares y extracelulares podían estar relacionadas con la transformación oncogénica (187). Además, se había observado que esta proteína era inducida por estrógenos en determinados órganos (útero e hipotálamo) (188).

El **factor de crecimiento de hepatocitos** (HGF, también denominado *scatter factor*, SF) es una citoquina multifuncional que regula la expresión de moléculas relacionadas con la adhesión celular, de manera que potencia la movilidad, y es clave en el desarrollo y la progresión del cáncer. La sobreexpresión de HGF y de su receptor Met, se han asociado a la invasividad del cáncer de mama humano, y puede ser un factor causante de metástasis; de hecho, se ha considerado como un signo de recurrencia prematura y supervivencia corta en las pacientes con cáncer de mama (189).

La **N-acilaminoacil-péptido hidrolasa** (EC 3.4.19.1), también denominada enzima liberadora de acilaminoácidos, es una serin-peptidasa tetramérica, probablemente implicada en la desacetilación de las cadenas peptídicas nacientes o de péptidos bioactivos. En humanos, su gen parece localizarse en el brazo corto del cromosoma 3, cuya delección se ha asociado al cáncer pulmonar de células pequeñas. De hecho, se ha observado una práctica desaparición de su expresión en diversas líneas celulares de este tipo de cáncer (190). También se ha observado la pérdida de su expresión en carcinomas renales, y se especuló que podría afectar a la actividad de un pequeño factor de crecimiento acetilado (191).

La proteína **p34** (o rbp34, de *ribosome-binding protein*) es un miembro de la superfamilia de proteínas con regiones repetidas ricas en leucina (192). Se trata de una proteína transmembranaria no glicosilada del retículo endoplásmico, que tiene el extremo aminoterminal enrollado en la parte citoplásmica, donde se sitúan las repeticiones, cuya supuesta función es intervenir en interacciones proteína-proteína. De hecho, se cree que p34, que se expresa en muchos tejidos diferentes, y que se encuentra como dímero en la célula, puede estar implicada en la señalización intracelular vía aFGF (193).

La proteína **StIP1** (*signal transducer and activator of transcription interacting protein*, o **Stat-3 interacting protein**) contiene 12 repeticiones WD40, que, al parecer, median en la formación de complejos multiproteínicos que representan un papel importante en la regulación de la transducción de señales, en la transcripción y en la proteólisis. StIP1 es capaz de interactuar con diversos miembros de la familia STAT (*signal transducer and activator of transcription*), y se ha observado su capacidad de unión también a las proteínas JAK, que intervienen en la señalización vía IL-6; por tanto, se especula que podría potenciar la interacción entre Stat (principalmente) y JAK (194).

Ramp2 (*receptor activity modifying protein 2*). Las Ramp son proteínas transmembranarias que transportan al receptor similar al receptor de la calcitonina (*calcitonin receptor-like receptor*, CRLR) hacia la superficie celular. El CRLR transportado por Ramp2 es un receptor de la adrenomedulina, un potente vasodilatador con un papel importante en la respuesta cardiovascular a diversas situaciones patológicas (infartos, sepsis) (revisión en (195)). Aparte de su interacción con CRLR, no está claro si Ramp2 tiene alguna otra función. Recientemente se ha determinado que la adrenomedulina se sobreexpresa en condiciones de hipoxia, al tiempo que la expresión de Ramp2 disminuye; ambas respuestas podrían formar parte del mecanismo de adaptación celular a la hipoxia (196).

DAM1 (*DNA amplified in mammary carcinoma*), un gen nuevo, identificado tras análisis por representación diferencial (*differential display*), que se localizó en 1p13.3-21 (197). Su expresión estaba aumentada en diversas líneas celulares de cáncer de mama, y en algunos casos se pudo asociar a amplificación génica. Este gen se ha denominado posteriormente **BCAS2** (*breast carcinoma amplified sequence 2*), y sólo se ha detectado su amplificación en algunos tumores mamarios (198). Aunque su secuencia es completamente homóloga a la del DNA de una proteína supuestamente asociada al espliceosoma, no hay datos aún sobre su función biológica.

ADAMTS1 (*a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1*), una proteína relacionada con la familia ADAM. La ADAMTS1 está formada por diversas regiones con características morfológicas y funcionales bien diferenciadas: una región pro, una zona de función proteásica con capacidad de unión a zinc, una región con características de desintegrina (que funciona como ligando de la integrina, y tiene la capacidad de interferir en las interacciones célula-matriz) y una zona carboxiterminal en la que se encuentran tres regiones homólogas a fragmentos de trombospondina 1. Este gen tiene un apartado específico en la presente tesis.

El gen de la subunidad 3 de la RNA polimerasa II, que se puede considerar como un activador de la transcripción (de hecho, es la proteína transcriptor).

El gen de una proteína similar al precursor de la proteína relacionada con la endozepina (proteína asociada a membrana, inhibidora de la unión al diazepam).

Nuevos genes. De las bandas diferencialmente expresadas, procedentes del RAP-PCR de MDA MB-435, la 5MDA y la 3MDA eran homólogas a fragmentos de genes de diversas proteínas hipotéticas. Tras el análisis Northern, se observa que en el caso de 5MDA, existe una mayor expresión en las células 435-Lung2, mientras que la expresión de 3MDA no presenta diferencias notables entre las distintas variantes.

5.4.- ESTUDIO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LAS CARACTERÍSTICAS INVASIVAS Y METASTÁSICAS CONFERIDAS POR ADAMTS1

Cuando se identificó el cDNA de ADAMTS1 en el cribado de la genoteca S15, y teniendo en cuenta las características conocidas de la proteína, con su al menos teórica multiplicidad de funciones (debido a sus regiones de desintegrina, metaloproteasa y trombospondina), se consideró que esta era un buen candidato a estar relacionada con la capacidad invasiva de las células tumorales que la expresaran.

Como se explica en la introducción, ADAMTS1 se secreta al medio extracelular con un péptido señal en posición aminoterminal, una zona metaloproteásica con un sitio de unión a Zn^{2+} y una región rica en cisteínas que contiene dos posibles “bucles de desintegrina”. La región carboxiterminal tiene tres zonas de fragmentos de trombospondina 1 (denominadas properdina o TSP) (88) con capacidad de unión a la heparina. Tras la secreción celular, ADAMTS1 se incorpora a la matriz extracelular mediante estas zonas, juntamente con la región carboxiterminal (87). La trombospondina 1 presenta propiedades antiangiogénicas: bloquea la formación de estructuras en tubo semejantes a los capilares e inhibe la proliferación de las células endoteliales. Los genes humanos METH-1 y METH-2, parcialmente homólogos a ADAMTS1 y ADAMTS-8 de ratón, respectivamente (89), tienen unos productos que son potentes inhibidores de la angiogénesis en modelos experimentales *in vitro*, mucho más que otras moléculas como la misma trombospondina.

El estudio de la expresión de METH-1 y METH-2 en líneas celulares de carcinoma pancreático, y en algunas muestras tumorales y tejidos normales de pacientes afectados, indicaba que la expresión de METH-1 se relacionaba con la invasión local y la diseminación hacia los ganglios linfáticos, y en conclusión con el pronóstico de los pacientes (90).

Por otra parte, dada la función de las moléculas de la familia ADAMTS como antiangiogénicos y como proteasas específicas, deben considerarse en los procesos de remodelación de las matrices extracelulares y de invasión tumoral. Así, se ha descrito que ADAMTS1 es una agreganasa, además de ser capaz de romper al versicano (93).

Al someter a una prueba Northern a los RNAs de los clones del modelo MXT que se han utilizado en el presente trabajo, empleando una sonda de ADAMTS1, se observó que la expresión del gen era muy distinta en clones de diferente capacidad metastásica. Así, de los clones estudiados, el B2 y el C1.1, que tienen una gran capacidad metastásica, tenían también una gran expresión de ADAMTS1, sobre todo B2; mientras que clones con escasa capacidad metastásica no expresaban este gen o lo hacían relativamente poco.

Para intentar conocer la importancia de la expresión de ADAMTS1 se trató de suprimirla (al menos parcialmente) en esos clones, y estudiar el efecto que esto tenía sobre las características invasivas de las células, tanto *in vitro* como *in vivo*. Para bloquear la expresión del gen en las células que lo expresaban, estas se transfectaron de manera estable con cDNA antisentido (del mismo gen) incluido en un plásmido.

La evaluación *in vitro* de la capacidad metastásica se realizó mediante el estudio de características relacionadas con la capacidad invasiva de las células (por ejemplo, la capacidad de adhesión a componentes de la matriz extracelular) y a la posibilidad de migración, tanto en las células originales como en las transfectadas. La evaluación *in vivo* se realizó inyectando en la mama de ratones los clones celulares originales y transfectados, y observando la diferente evolución de los tumores en los animales.

En la prueba para evaluar la migración se medía la capacidad de las células para atravesar un filtro de colágeno IV, que es uno de los componentes de la matriz extracelular. En el presente trabajo se ha observado un aumento de la capacidad migratoria de las células transfectadas con el cDNA en antisentido de ADAMTS1: las células B2 transfectadas, con menor expresión de ADAMTS1, presentaban una capacidad un 67% mayor que las células B2 sin transfectar. La migración es un fenómeno en que se produce un movimiento de las células a través de la matriz extracelular, para el que es necesario que exista primero una protrusión de la célula seguida de una fijación a algún elemento de la matriz y un posterior desplazamiento de todo el cuerpo celular hacia la zona que se había desplazado al principio. Es decir, que para que las células se muevan es necesaria una cierta capacidad de adhesión al sustrato: ni muy fuerte (lo que impediría la libertad de movimiento) ni muy débil (lo que impediría la fijación celular y la posterior tracción). Por tanto, si en las células transfectadas este fenómeno se da con mayor "facilidad", es probable que la disminución en la expresión de ADAMTS1 suponga una variación en la capacidad de unión de las células a elementos de la matriz. Es razonable pensar que esta variación podría ser una disminución de la adhesión a alguno o algunos componentes de la matriz.

El resultado de las pruebas de adhesión indica que las células B2 transfectadas con cDNA antiADAMTS1 no ven alterada sensiblemente su capacidad de adhesión a los distintos componentes de la matriz extracelular probados en el presente trabajo (las diferencias son inferiores a un 10%); en el caso del ácido hialurónico, el hecho de que las células B2 formasen agregados no permitió calcular la influencia de la disminución de la expresión de ADAMTS1.

Por tanto, aunque la capacidad migratoria de las células B2 a través del colágeno IV aumentó al disminuir la expresión de ADAMTS1, esto no parece deberse a una variación en la adhesión a dicho sustrato en particular (ni a ningún otro de los probados). Sin embargo, también es cierto que la actividad proteolítica de ADAMTS1 podría representar algún papel en el proceso de migración, aunque resulte aparentemente contradictorio que una posible disminución en la actividad proteolítica en la matriz extracelular haga aumentar la capacidad migratoria de las células.

En cuanto al efecto del cambio de la expresión de ADAMTS1 sobre el crecimiento y la capacidad metastásica *in vivo*, los resultados obtenidos indican que la expresión reducida de ADAMTS1 se correlaciona con un aumento en el tiempo de latencia de los tumores, pero

no en el crecimiento de estos a partir de 10 mm de diámetro. En experimentos previos de proliferación *in vitro*, no se habían observado diferencias entre las células B2 y las B2 transfectadas (datos no mostrados), lo que indica que la expresión de ADAMTS1 no modifica la capacidad de proliferación celular. Puesto que en el crecimiento inicial de los tumores *in vivo* uno de los factores primordiales es la neoangiogénesis, podría ocurrir que el número de vasos nuevos que se forman en las células B2 transfectantes fuese inferior al de las B2. Teniendo en cuenta la estructura de ADAMTS1, con su potencial multifuncionalidad, sería posible que su actividad proteolítica generase fragmentos peptídicos con potencial angiogénico.

Por otra parte, se comprobó que en las células B2 los niveles de expresión de ADAMTS1 no afectaban a la supervivencia de los animales: los ratones inoculados con las células B2 o con las células B2-antiADAMTS1 estuvieron sanos hasta el momento de su sacrificio, y no desarrollaron metástasis espontáneas detectables en la necropsia practicada a los 90 días después de la exéresis del tumor primario. Por lo que respecta a la capacidad de desarrollar metástasis experimentales (es decir, tras la inyección intravenosa de estas células), que es nula en las células B2, tampoco se vio afectada por la disminución de la expresión de ADAMTS1 (datos no mostrados).

Estas observaciones indican que, en el modelo MXT-B2, la disminución de la expresión de ADAMTS1 no es capaz de influir *per se* en la diseminación espontánea de las células metastásicas, lo que sugiere que probablemente estas células además de un aumento de motilidad precisen de la expresión de otras proteínas -como las gelatinasas- que faciliten la invasión a través del colágeno IV. Resultados previos de nuestro grupo apuntan que las células B2 no expresan niveles detectables de gelatinasa A (MMP-2) a diferencia de las células MXT-C1.1, las cuales metastatizan espontáneamente (199). Por otra parte, las células MXT-B2 expresan niveles detectables (únicamente por zimografía) de gelatinasa B (MMP-9) que creemos podría influenciar también la diseminación espontánea de metástasis de las células B2 desde los tumores primarios. En la actualidad se están realizando en nuestro laboratorio experimentos complementarios con dobles transfectantes utilizando el cDNA de MMP-9 y el de ADAMTS1 en sentido y antisentido en las células B2 y en las células C1.1, que suponemos podrían modificar la formación de metástasis *in vivo*.

5.6.- ESTUDIO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LAS CARACTERÍSTICAS INVASIVAS Y METASTÁSICAS CONFERIDAS POR CIITA

En el presente trabajo, se ha utilizado la técnica de RAP-PCR para analizar las diferencias entre variantes poco metastásicas (Brain-1) y muy metastásicas (Lung-2). En trabajos previos (130), no se habían encontrado diferencias entre ellas en cuanto a proliferación, invasión o migración; por tanto, se esperaba identificar transcritos que pudieran contribuir a la organoespecificidad o a la capacidad metastásica, más que genes que intervinieran en el “encendido” o “apagado” del proceso metastásico, como hacen comúnmente los llamados “genes asociados a metástasis”. Cuando se compararon las bandas del RAP, se observaron sobre todo cambios en la intensidad (aumentos y disminuciones) más que ganancias o pérdidas absolutas de la expresión. A primera vista, esto podría sugerir que muchos de los genes sufren una regulación al alza o a la baja de su expresión durante el proceso, que les lleva a adquirir capacidad metastásica.

La expresión del gen de la cadena β de HLA-DP en las células 435-Lung2 se encontraba muy disminuida. Los cambios en la expresión de las agrupaciones de genes de antígenos MHC-II parecen frecuentes en tumores y metástasis sólidas, aunque su significación no está clara. Además, resultaba sorprendente la detección de estas diferencias en un gen del MHC-II, puesto que se trabajaba con un modelo tumoral en el que tanto las células poco metastásicas como las muy metastásicas se habían implantado en ratones atímicos (con baja capacidad inmunológica), y en unas y otras variantes habían producido tumores primarios.

Para conocer la posible ventaja que podría ofrecer la supresión de la expresión de MHC-II, se trató de analizar el mecanismo subyacente. En primer lugar, se observó que el nivel de expresión de CIITA (transactivador CIITA del MHC-II) se encuentra disminuido en 435-Lung2, como el de la cadena β de HLA-DP, de donde se deduce una correlación entre MHC-II y CIITA en este aspecto.

Además, en el presente trabajo se demuestra que en los ratones atímicos en que se inyectan las células 435-Lung2 transfectadas establemente con CIITA, y que expresan los isotipos de MHC-II, se reducen notablemente la incidencia y el crecimiento de tumores primarios. De hecho, el tiempo de latencia aumentó, y algunos de los tumores comenzaron un proceso de regresión espontánea al alcanzar 1mm^3 de volumen en la localización primaria. Puesto que los datos indican que la expresión de CIITA no altera la proliferación *in vitro* en condiciones estándar, y además no se observan diferencias en el recuento de vesículas en los tumores en crecimiento con respecto a los tumores obtenidos a partir de células 435-Brain1 o de células 435-Lung2 pseudotransfectantes (datos no mostrados), se puede atribuir el aumento de la latencia y la regresión del tumor al sistema inmune.

No están del todo claras las respuestas inmunes que la sobreexpresión de CIITA por parte de las células tumorales puede provocar en los ratones atímicos. Probablemente, la

actividad NK y la citotoxicidad dependiente de los anticuerpos y mediada por las células K están implicadas en el rechazo de los tumores por los ratones atímicos. También es posible que los niveles de CIITA en los transfectantes CIITA puedan provocar un exceso de presentación de los antígenos MHC-II (135), capaces de activar a unos cuantos precursores de los linfocitos T citolíticos que permanecen en la sangre, así como a los ganglios linfáticos, lo que conduciría al rechazo del tumor. De hecho, la expresión de MHC-II y CIITA es decisiva para el rechazo del tumor en los ratones (160) y las ratas C6 (200). Aparte de su papel fundamental en la expresión de MHC-II, y su posible implicación en el “ajuste fino” de la expresión de MHC-I, se cree que CIITA está implicada en la regulación de otros genes, como los de citoquinas, cuya sobreexpresión puede influir en la respuesta inmune contra los tumores.

En el presente trabajo se ha analizado, además, la tumorigenicidad de los transfectantes CIITA en los ratones SCID para valorar si un huésped con deficiencia de linfocitos B y T da a las células MHC-II la inmunotolerancia que permite el crecimiento del tumor. De hecho, en nuestros estudios *in vivo* en los ratones SCID se observó que no había diferencias, ni en cuanto a la incidencia de tumores ni en cuanto a su volumen, entre los transfectante CIITA y los controles 3 semanas después de la inoculación. Tras extirpar todos los tumores a los ratones para permitir un mayor tiempo de supervivencia que permitiera el desarrollo de metástasis, se observó que los transfectantes CIITA desarrollaban metástasis en ganglios linfáticos distantes, pero no se encontraron metástasis pulmonares en ninguno de los animales. Sin embargo, en este momento no se pueden extraer conclusiones definitivas porque la supervivencia de los ratones con los ganglios linfáticos afectados era escasa más allá de 2 meses.

El mecanismo de la inhibición de la transcripción de CIITA en las células 435-Lung2 permanece sin aclarar, como tampoco se sabe si es específico de las células metastásicas. La transcripción de CIITA está regulada por cuatro promotores distintos. El promotor IV controla la expresión inducible por IFN- γ , y se ha observado (datos no presentados en este trabajo (154) que es responsable de la transcripción de CIITA en las células 435-Brain1. El que la inhibición de la DNA-metiltransferasa (es decir, la inhibición de un proceso de metilación) restablezca la expresión de moléculas del MHC-II en las células 435-Lung2, en las que está suprimida, sugiere que la metilación del DNA puede estar implicada en el proceso. Sin embargo, en el mismo trabajo de Shi no se ha podido demostrar que hubiera diferencias en la metilación del DNA entre las variantes 435-Brain1 y 435-Lung2. Esto sugiere que puede existir un gen intermediario cuya metilación influya en la actividad transcripcional del promotor IV del transactivador CIITA.

En conclusión, en este estudio se ha conectado la aparición del fenotipo metastásico con la ausencia de expresión de genes ya caracterizados del MHC-II, que no habían sido asociados previamente con la metástasis. Asimismo, se ha establecido que la expresión de

CIITA es probablemente responsable del disparo de la expresión de dichos genes, y que en esa situación las células con gran capacidad metastásica pueden perderla en parte.

6.- CONCLUSIONES

1.- El método RAP-PCR permite la detección de RNAs anónimos correspondientes a genes que se expresan diferencialmente en variantes con distinta capacidad metastásica, pero que comparten un acervo genético común.

2.- El número total de bandas detectadas por su expresión diferencial en los modelos tumorales MXT y MDA MB-435 fue superior a 50. A partir de algunas de ellas, se han identificado diversos genes.

2.1.- Los de **mayor expresión en las variantes metastásicas** fueron los correspondientes a enolasa, ESDN (*endothelial and smooth muscle cell-derived neuropilin-like protein*), S-adenosilhomocisteína hidrolasa, CHL1 (*close homolog to L1CAM*), Slmap (*sarcolemmal-associated protein*), eEF-1 α . (factor de elongación 1 α), Nono (*non-POU domain-containing octamer-binding protein*), moesina, eplin (*epithelial protein lost in neoplasm*), ADAMTS1, y a la proteína hipotética FLJ10830, aún no identificada (en el presente trabajo, se ha denominado 5MDA).

2.2.- Los de **menor expresión en las variantes metastásicas** fueron los correspondientes a la cadena β de HLA-DP, la enzima E2 (variante 1) (*ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1*), y el gen denominado 7MXT en el presente trabajo.

2.3.- Además, se identificaron los siguientes genes: el de la fosfolipasa C-L(2) (*phospholipase C-like protein-(2)*), tbc1d1 (*tre-2/USP6, BUB2, cdc16 domain family, member 1*), el de la subunidad 3 de la RNA polimerasa II, el de una proteína asociada a membrana inhibidora de la unión al diazepam, y bcas2 (*breast carcinoma amplified sequence 2*) o dam1 (*DNA amplified in mammary carcinoma*),

2.4.- Se han detectado también **cdNAs híbridos**, probablemente debidos a una recombinación entre dos genes: Erp57 / *HGF-like protein* (o bien Erp57 / N-acilaminoacilpéptido hidrolasa), Erp57 / p34 (o rbp34, de *ribosome-binding protein*), Erp57 / Stlp (*signal transducer and activator of transcription interacting protein*, o *Stat-3 interacting protein*), Ramp2 (*receptor activity modifying protein 2*) / gen desconocido; otras parejas detectadas implicaban también a genes no identificados o hipotéticos.

2.5.- La función de estos genes puede adscribirse a alguna de las siguientes categorías: metabolismo celular (aproximadamente el 10%), regulación de la expresión génica (24%), angiogénesis / diferenciación / invasión (21%), proliferación celular (10%); además, hay una serie de genes aún no identificados o cuya función todavía no es bien conocida (34%).

3.- El gen anónimo denominado **7MXT** todavía no ha sido identificado, aunque se sabe que se encuentra en el cromosoma 11 del ratón. Su expresión está claramente disminuida en las variantes más metastásicas, pero se expresa en grado diverso en todos los órganos embrionarios de ratón en que se ha probado; la expresión más abundante corresponde al

bazo y al corazón. Sin embargo, en los ratones adultos sólo se ha detectado su expresión en el bazo y sobre todo en el ovario.

4.- La disminución de la expresión de ADAMTS1:

4.1.- Hace que aumente la capacidad migratoria de las células tumorales B2 a través del colágeno IV; sin embargo, no modifica la capacidad de adhesión de estas células a los distintos componentes de la matriz extracelular.

4.2.- Hace que aumente el tiempo de latencia de crecimiento de los tumores primarios, pero no modifica la capacidad metastásica.

5.- Existe una conexión entre la aparición del fenotipo metastásico y la ausencia de expresión del gen de la **cadena β de HLA**, una proteína del MHC-II que no se había asociado previamente con la metástasis. Además, la expresión de **CIITA** (transactivador del MHC-II), determina la expresión de MHC-II en las variantes metastásicas.

7.- BIBLIOGRAFÍA

- (1) Botha J, Bray F, Sankila R, Parkin DM. Breast cancer incidence and mortality trends in 16 European countries. *Eur J Cancer* 2003;39:1718-29.
- (2) Rosen PP. Coexistent lobular carcinoma in situ and intraductal carcinoma in a single lobular-duct unit. *Am J Surg Pathol* 1980;4:241-6.
- (3) Page D, Dupont WD, Rogers LW, Landenberger M. Intraductal carcinoma of the breast: follow-up after biopsy only. *Cancer* 1982;49:751-8.
- (4) Osborne M, Hoda SA. Current management of lobular carcinoma in situ of the breast. *Oncology (Huntingt)* 1994;8:45-9; discussion 9, 53-4.
- (5) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-32.
- (6) Fujii H, Marsh C, Cairns P, Sidransky D, Gabrielson E. Genetic divergence in the clonal evolution of breast cancer. *Cancer Res* 1996;56:1493-7.
- (7) Trent J, Meltzer PJM, Meltzer PSS. The last shall be first. *Nat Genet.* 1993;3:101-2.
- (8) Nishizaki T, Chew K, Chu L, Isola J, Kallioniemi A, Weidner N, Waldman FM. Genetic alterations in lobular breast cancer by comparative genomic hybridization. *Int J Cancer* 1997;74:513-7.
- (9) Knudson AG J. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68:820-3.
- (10) McKay R, Frederiksen K, Jat PJ, Levy D. Reconstructing the brain from immortal cell lines. *Prog Brain Res* 1988;78:647-9.
- (11) Devilee P, van den Broek M, Kuipers-Dijkshoorn N, Kolluri R, Khan PM, Pearson PL, Cornelisse CJ. At least four different chromosomal regions are involved in loss of heterozygosity in human breast carcinoma. *Genomics* 1989;5:554-60.
- (12) Hupp T, Lane DP, Ball KL. Strategies for manipulating the p53 pathway in the treatment of human cancer. *Biochem J* 2000;352 Pt 1:1-17.
- (13) Birch JM. Familial cancer syndromes and clusters. *Br Med Bull.* 1994;50:624-39.
- (14) Byers T. Nutritional risk factors for breast cancer. *Cancer.* 1994;74:288-95.
- (15) Bray F, Sankila R, Ferlay J, Parkin DM. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. *Eur J Cancer* 2002;38:99-166.
- (16) Nowell PC. Diagnostic and prognostic value of chromosome studies in cancer. *Ann Clin Lab Sci* 1974;4:234-40.
- (17) Kerbel R, Waghorne C, Korczak B, Breitman ML. Clonal changes in tumours during growth and progression evaluated by southern gel analysis of random integrations of foreign DNA. *Ciba Found Symp* 1988;141:123-48.
- (18) Fidler I, Radinsky R. Genetic control of cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82:166-8.
- (19) Fidler I, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science.* 1977;197:893-5.
- (20) Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1898;1:99-101.
- (21) Watson C, Medina D, Clark JH. Characterization and estrogen stimulation of cytoplasmic progesterone receptor in the ovarian-dependent MXT-3590 mammary tumor line. *Cancer Res* 1979;39:4098-104.
- (22) Kiss R, Paridaens RJ, Heuson JC, Danguy AJ. Effect of progesterone on cell proliferation in the MXT mouse hormone-sensitive mammary neoplasm. *J Natl Cancer Inst* 1986;77:173-8.
- (23) Cailleau R, Olive M, Cruciger QV. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro.* 1978;14:911-5.
- (24) Price J, Polyzos A, Zhang RD, Daniels LM. Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res.* 1990;50:717-21.
- (25) Harris J, Best MW. Dynamic heterogeneity: metastatic variants to liver are generated spontaneously in mouse embryonal carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis.* 1988;6:451-62.

- (26) Ichikawa T, Ichikawa Y, Isaacs JT. Genetic factors and suppression of metastatic ability of prostatic cancer. *Cancer Res* 1991;51:3788-92.
- (27) Luu H, Zagaja GP, Dubauskas Z, Chen SL, Smith RC, Watabe K, Ichikawa Y, Ichikawa T, Davis EM, Le Beau MM, Rinker-Schaeffer CW. Identification of a novel metastasis-suppressor region on human chromosome 12. *Cancer Res* 1998;58:3561-5.
- (28) Chekmareva M, Hollowell CM, Smith RC, Davis EM, LeBeau MM, Rinker-Schaeffer CW. Localization of prostate cancer metastasis-suppressor activity on human chromosome 17. *Prostate* 1997;33:271-80.
- (29) Miele M, Robertson G, Lee JH, Coleman A, McGary CT, Fisher PB, Lugo TG, Welch DR. Metastasis suppressed, but tumorigenicity and local invasiveness unaffected, in the human melanoma cell line MelJuSo after introduction of human chromosomes 1 or 6. *Mol Carcinog* 1996;4:284-99.
- (30) You J, Miele ME, Dong C, Welch DR. Suppression of human melanoma metastasis by introduction of chromosome 6 may be partially due to inhibition of motility, but not to inhibition of invasion. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;208:476-84.
- (31) Nihei N, Ohta S, Kuramochi H, Kugoh H, Oshimura M, Barrett JC, Isaacs JT, Igarashi T, Ito H, Masai M, Ichikawa Y, Ichikawa T. Metastasis suppressor gene(s) for rat prostate cancer on the long arm of human chromosome 7. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;24:1-8.
- (32) Kuramochi H, Ichikawa T, Nihei N, Kawana Y, Suzuki H, Schalken JA, Takeichi M, Nagafuchi A, Ito H, Shimazaki J. Suppression of invasive ability of highly metastatic rat prostate cancer by introduction of human chromosome 8. *Prostate* 1997;31:14-20.
- (33) Phillips K, Welch DR, Miele ME, Lee JH, Wei LL, Weissman BE. Suppression of MDA-MB-435 breast carcinoma cell metastasis following the introduction of human chromosome 11. *Cancer Res* 1996;56:1222-7.
- (34) Yang X, Welch DR, Phillips KK, Weissman BE, Wei LL. KAI1, a putative marker for metastatic potential in human breast cancer. *Cancer Letter* 1997;11:149-55.
- (35) Lee J, Welch DR. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res* 1997;57:2384-7.
- (36) Yoshida B, Dubauskas Z, Chekmareva MA, Christiano TR, Stadler WM, Rinker-Schaeffer CW. Mitogen-activated protein kinase kinase 4/stress-activated protein/Erk kinase 1 (MKK4/SEK1), a prostate cancer metastasis suppressor gene encoded by human chromosome 17. *Cancer Res* 1999;59:5483-7.
- (37) Seraj M, Samant RS, Verderame MF, Welch DR. Functional evidence for a novel human breast carcinoma metastasis suppressor, BRMS1, encoded at chromosome 11q13. *Cancer Res* 2000;60:2764-9.
- (38) Yoshida B, Sokoloff MM, Welch DR, Rinker-Schaeffer CW. Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field. *J. Natl Cancer Inst* 2000;92:1717-30.
- (39) Toh Y, Pencil SD, Nicolson GL. A novel candidate metastasis-associated gene, mta-1, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines. *J Biol Chem* 1994;269:22958-63.
- (40) Schalken J, Ebeling SB, Isaacs JT, et al. Down modulation of fibronectin messenger RNA in metastasizing rat prostatic cancer cells revealed by differential hybridization analysis. *Cancer Res* 1988;48:2042-6.
- (41) Dear T, Ramshaw IA, Kefford RF. Differential expression of a novel gene, WDNM1, in nonmetastatic rat mammary adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 1988;48:5203-9.
- (42) Dear T, McDonald DA, Kefford RF. Transcriptional down-regulation of a rat gene, WDNM2, in metastatic DMBA-8 cells. *Cancer Res* 1989;49:5323-8.
- (43) Steeg P, Bevilacqua G, Kopper L, et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1988;80:200-4.
- (44) Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992;257:967-71.
- (45) Welsh J, Chada K, Dalal SS, Cheng R, Ralph D, McClelland M. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res* 1992;20:4965-70.

- (46) Duggan DJ. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nature Genetics* 1999;21:10-4.
- (47) Lockhart D, Winzeler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 2000;405:827-36.
- (48) Schulze A, Downward J. Navigating gene expression using microarrays--a technology review. *Nature Cell Biol* 2001;3:E190-5.
- (49) Lander ES. Array of hope. *Nat Genet* 1999;21:3-4.
- (50) Kasper C, Rasmussen H, Kastrup JS, Ikemizu S, Jones EY, Berezin V, Bock E, Larsen IK. Structural basis of cell-cell adhesion by NCAM. *Nat Struct Biol*. 2000;7:389-93.
- (51) Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1994;1198:11-26.
- (52) Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:619-27.
- (53) Kemler R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet* 1993;9:317-21.
- (54) Behrens J. Cadherins as determinants of tissue morphology and suppressors of invasion. *Acta Anat (Basel)* 1994;149:165-9.
- (55) Perl A, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 1998;392:190-3.
- (56) Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 1999;24:73-6. Review.
- (57) Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 2001;29:117-29.
- (58) Santibanez J, Frontelo P, Iglesias M, Martinez J, Quintanilla M. Urokinase expression and binding activity associated with the transforming growth factor beta1-induced migratory and invasive phenotype of mouse epidermal keratinocytes. *J Cell Biochem* 1999;74:61-73.
- (59) Kupferman M, Fini ME, Muller WJ, Weber R, Cheng Y, Muschel RJ. Matrix metalloproteinase 9 promoter activity is induced coincident with invasion during tumor progression. *Am J Pathol* 2000;157:1777-83.
- (60) Johansson N, Ala-aho R, Uitto V-J, Grénman R, Fusenig NE, López-Otín C and Kähäri V-M. Expression of collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) by transformed keratinocytes is dependent on the activity of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Cell Sci* 2000;113:227-35.
- (61) Giancotti F, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999;285:1028-32.
- (62) Castronovo V, Luyten F, van den Brule F, Sobel ME. Identification of a 14-kDa laminin binding protein (HLBP14) in human melanoma cells that is identical to the 14-kDa galactoside binding lectin. *Arch Biochem Biophys* 1992;297:132-8.
- (63) Terranova V, Rao CN, Kalebic T, Margulies IM, Liotta LA. Laminin receptor on human breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80:444-8.
- (64) Rao C, Margulies IM, Tralka TS, Terranova VP, Madri JA, Liotta LA. Isolation of a subunit of laminin and its role in molecular structure and tumor cell attachment. *J Biol Chem* 1982;257:9740-4.
- (65) Castronovo V, Campo E, van den Brule FA, Claysmith AP, Cioce V, Liu FT, Fernandez PL, Sobel ME. Inverse modulation of steady-state messenger RNA levels of two non-integrin laminin-binding proteins in human colon carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1161-9.
- (66) Yow H, Wong JM, Chen HS, Lee CG, DaHK, Wong JM, Chen HS, Lee CG, Davis S, Steele GD Jr, Chen LB. Increased mRNA expression of a laminin-binding protein in human colon carcinoma: complete sequence of a full-length cDNA encoding the protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85:176394-8.
- (67) Varani J, Lovett EJJ, Lovett EJ 3rd, McCoy JP Jr, Shibata S, Maddox DE, Goldstein IJ, Wicha M. Differential expression of a laminin-like substance by high- and low-metastatic tumor cells. *Am J Pathol*. 1983;111:27-34.

- (68) Cioce V, Castronovo V, Shmookler BM, Garbisa S, Grigioni WF, Liotta LA, Sobel ME. Increased expression of the laminin receptor in human colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:29-36.
- (69) Castronovo V, Colin C, Claysmith AP, Chen PH, Lifrange E, Lambotte R, Krutzsch H, Liotta LA, Sobel ME. Immunodetection of the metastasis-associated laminin receptor in human breast cancer cells obtained by fine-needle aspiration biopsy. *Am J Pathol* 1990;137:1373-81.
- (70) Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991;65:13-24.
- (71) Matsamura Y, Tariin D. Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 1992;340:1053-8.
- (72) Wielenga V, Heider KH, Offerhaus GJ, Adolf GR, van den Berg FM, Ponta H, Herrlich P, Pals ST. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res.* 1993;53:4754-6.
- (73) Okamoto I, Kawano Y, Tsuiki H, Sasaki J, Nakao M, Matsumoto M, Suga M, Ando M, Nakajima M, Saya H. CD44 cleavage induced by a membrane-associated metalloprotease plays a critical role in tumor cell migration. *Oncogene* 1999;18:1435-46.
- (74) Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* 2001;11:S37-43.
- (75) Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 2002;21:2245-52.
- (76) Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2000;10:415-33.
- (77) Wolfsberg T, Primakoff P, Myles DG, White JM. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J Cell Biol* 1995;131:275-8.
- (78) Wolfsberg T, White JM. ADAMs in fertilization and development. *Dev Biol* 1996;180:389-401.
- (79) Alfandari D, Cousin H, Gaultier A, Smith K, White JM, Darribere T, DeSimone DW. *Xenopus* ADAM 13 is a metalloprotease required for cranial neural crest-cell migration. *Curr Biol* 2001;11:918-30.
- (80) Inoue D, Reid M, Lum L, Kratzschmar J, Weskamp G, Myung YM, Baron R, Blobel CP. Cloning and initial characterization of mouse meltrin beta and analysis of the expression of four metalloprotease-disintegrins in bone cells. *J Biol Chem* 1998;273:4180-7.
- (81) Iba K, Albrechtsen R, Gilpin BJ, Loechel F, Wewer UM. Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion. *Am J Pathol* 1999;154:1489-501.
- (82) Black R, White JM. ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:654-9.
- (83) Blobel CP. Metalloprotease-disintegrins: links to cell-adhesion and cleavage of TNF and Notch. *Cell* 1997;90:589-92.
- (84) Cal S, Obaya AJ, Llamazares M, Garabaya C, Quesada V, Lopez-Otin C. Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene* 2002;283:49-62.
- (85) Kuno K, Kanada N, Nakashima E, Fujiki F, Ichimura F, Matsushima K. Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J Biol Chem* 1997;272:556-62.
- (86) Shindo T, Kurihara H, Kuno K, Yokoyama H, Wada T, Kurihara Y, Imai T, Wang Y, Ogata M, Nishimatsu H, Moriyama N, Oh-hashii Y, Morita H, Ishikawa T, Nagai R, Yazaki Y, Matsushima K. ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J Clin Invest.* 2000;105:1345-52.

- (87) Kuno K, Matsushima K. ADAMTS-1 protein anchors at the extracellular matrix through the thrombospondin type I motifs and its spacing region. *J Biol Chem* 1998;273:13912-7.
- (88) Tolsma S, Volpert OV, Good DJ, Frazier WA, Polverini PJ, Bouck N. Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol*. 1993;122:497-511.
- (89) Vazquez F, Hastings G, Ortega MA, Lane TF, Oikemus S, Lombardo M, Iruela-Arispe ML. METH-1, a human ortholog of ADAMTS-1, and METH-2 are members of a new family of proteins with angio-inhibitory activity. *J Biol Chem* 1999;274:23349-57.
- (90) Masui T, Hosotani R, Tsuji S, Miyamoto Y, Yasuda S, Ida J, Nakajima S, Kawaguchi M, Kobayashi H, Koizumi M, Toyoda E, Tulachan S, Arai S, Doi R, Imamura M. Expression of METH-1 and METH-2 in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:3437-43.
- (91) Fernandes R, Hirohata S, Engle JM, Colige A, Cohn DH, Eyre DR, Apte SS. Procollagen II amino propeptide processing by ADAMTS-3. Insights on dermatosparaxis. *J Biol Chem* 2001;276:31502-9.
- (92) Tortorella M, Burn TC, Pratta MA, Abbaszade I, Hollis JM, Liu R, Rosenfeld SA, Copeland RA, Decicco CP, Wynn R, Rockwell A, Yang F, Duke JL, Solomon K, George H, Bruckner R, Nagase H, Itoh Y, Ellis DM, Ross H, Wiswall BH, Murphy K, Hillman MC Jr, Hollis GF, Arner EC, et al. Purification and cloning of aggrecanase-1: a member of the ADAMTS family of proteins. *Science*. 1999;284:1664-6.
- (93) Rodriguez-Manzaneque J, Westling J, Thai SN, Luque A, Knauper V, Murphy G, Sandy JD, Iruela-Arispe ML. ADAMTS1 cleaves aggrecan at multiple sites and is differentially inhibited by metalloproteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:501-8.
- (94) Gherardi E, Stoker M. Hepatocytes and scatter factor. *Nature* 1990;346:228.
- (95) Liotta L, Guirguis RA, Schiffmann E. Tumor autocrine motility factor. *Prog Clin Biol Res* 1986;212:17-24.
- (96) Hulsken J, Behrens J, Birchmeier W. Tumor-suppressor gene products in cell contacts: the cadherin-APC-armadillo connection. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:711-6.
- (97) Janmey P, Chaponnier C. Medical aspects of the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:111-7.
- (98) Lu X, Wu X, Plemenitas A, Yu H, Sawai ET, Abo A, Peterlin BM. CDC42 and Rac1 are implicated in the activation of the Nef-associated kinase and replication of HIV. *Curr. Biol*. 1996; 6:1677-84.
- (99) Webb M, Hunter JL. Interaction of GTPase-activating protein with p21ras, measured using a continuous assay for inorganic phosphate release. *Biochem J* 1992;287 (Pt 2):555-9.
- (100) VanAelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev* 1997;11:2295-322.
- (101) Stossel T. On the crawling of animal cells. *Science*. 1993;260:1086-94.
- (102) Price L, Collard JG. Regulation of the cytoskeleton by Rho-family GTPases: implications for tumour cell invasion. *Semin Cancer Biol* 2001;11:167-73.
- (103) Hirao M, Sato N, Kondo T, Yonemura S, Monden M, Sasaki T, Takai Y, Tsukita S. Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J Cell Biol* 1996;135:37-51.
- (104) Sotiropoulos A, Gineitis D, Copeland J, Treisman R. Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell* 1999;98:159-69.
- (105) Teramoto H, Coso OA, Miyata H, Igishi T, Miki T, Gutkind JS. Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family. *J Biol Chem* 1996;271:27225-8.
- (106) Miki H, Suetsugu S, Takenawa T. WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J* 1998;17:6932-41.

- (107) Allen W, Zicha D, Ridley AJ, Jones GE. A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J Cell Biol* 1998;141:1147-57.
- (108) del Pozo M, Vicente-Manzanares M, Tejedor R, Serrador JM, Sanchez-Madrid F. Rho GTPases control migration and polarization of adhesion molecules and cytoskeletal ERM components in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1999;29:3609-20.
- (109) Symons M. Rho family GTPases: the cytoskeleton and beyond. *Trends Biochem Sci* 1996;21:178-81.
- (110) Michaely P, Mineo C, Ying YS, Anderson RG. Polarized distribution of endogenous Rac1 and RhoA at the cell surface. *J Biol Chem* 1999;274:21430-6.
- (111) Galbiati F, Razani B, Lisanti MP. Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* 2001;106:403-11.
- (112) Edidin M. Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. *Trends Cell Biol* 2001;11:492-6.
- (113) Lawler J. The functions of thrombospondin-1 and-2. *Curr Opin Cell Biol* 2000;12:634-40.
- (114) Jiménez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N. Essential in vivo signals mediating apoptosis-dependent inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1. *Nature Medicine* 2000;6:41-8.
- (115) Jiménez B, Volpert OV. Mechanistic insights on the inhibition of tumor angiogenesis. *Journal of Molecular Medicine* 2001;78:663- 72.
- (116) Dameron KM VO, Tainsky MA, Bouck N. The p53 tumor suppressor gene inhibits angiogenesis by stimulating the production of thrombospondin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1994;59:483-9.
- (117) Welch D, Fabra A, Nakajima M. Transforming growth factor beta stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential or beta stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7678-82.
- (118) Fabra A, Nakajima M, Bucana CD, Fidler IJ. Modulation of the invasive phenotype of human colon carcinoma cells by organ specific fibroblasts of nude mice. *Differentiation.* 1992;52:101-10.
- (119) Nicolson G. Paracrine and autocrine growth mechanisms in tumor metastasis to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 1993;12:325-43.
- (120) Fidler I, Fabra A, Nakajima M, Radinsky R. Genetic and epigenetic Regulation of Human Colon Carcinoma Metastasis. In *Metastasis: basic research and its clinical applications.* Vol 44. Basel; 1992. p. 13-26.
- (121) Fidler IJ. Critical determinants of metastasis. *Semin Cancer Biol.* 2002;12:89-96.
- (122) Nikiforov M, Hagen K, Ossovskaya VS, Connor TM, Lowe SW, Deichman GI, Gudkov AV. p53 modulation of anchorage independent growth and experimental metastasis. *Oncogene* 1996;13:1709-19.
- (123) Radinsky. Paracrine growth regulation of human colon carcinoma organ-specific metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 1993;12:345-61.
- (124) Sierra A, Castellsague X, Coll T, Manas S, Escobedo A, Moreno A, Fabra A. Expression of death-related genes and their relationship to loss of apoptosis in T1 ductal breast carcinomas. *Int J Cancer.* 1998;79:103-10.
- (125) Shtivelman E. A link between metastasis and resistance to apoptosis of variant small cell lung carcinoma. *Oncogene* 1997;14:2167-73.
- (126) Stevanovic S. Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:514-20.
- (127) Ferrone S, Finerty JF, Jaffee EM, Nabel GJ. How much longer will tumour cells fool the immune system? *Immunol Today* 2000;21:70-2.
- (128) Chappell D, Restifo NP. T cell-tumor cell: a fatal interaction? *Cancer Immunol Immunother* 1998;47:65-71.
- (129) Engers R, Gabbert HE. Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000;126:682-92.

- (130) Price J, Fabra A, Zhang RD, Radinsky R, Pathak S. Characterization of Variants of a Human Breast Cancer Cell line isolated from metastases in different organs of nude mice. *Int J Oncol* 1994;5.
- (131) Maiorana A, Cesinaro AM, Fano RA, Collina G. Expression of MHC class I and class II antigens in primary breast carcinomas and synchronous nodal metastases. *Clin Exp Metastasis* 1995;13:43-8.
- (132) Steimle V, Reith W, Mach B. Major histocompatibility complex class II deficiency: a disease of gene regulation. *Adv Immunol* 1996;61:327-40.
- (133) Harton J, Ting JP. Class II transactivator: mastering the art of major histocompatibility complex expression. *Mol Cell Biol* 2000;20:6185-94.
- (134) Gobin S, Peijnenburg A, van Eggermond M, van Zutphen M, van den Berg R, van den Elsen, PJ. The RFX complex is crucial for the constitutive and CIITA-mediated transactivation of MHC class I and beta2-microglobulin genes. *Immunity* 1998;9:531-41.
- (135) Otten LA, Steimle V, Bontron S, Mach B. Quantitative control of MHC class II expression by the transactivator CIITA. *Eur J Immunol* 1998;28:473-8.
- (136) Boss J. Regulation of transcription of MHC class II genes. *Curr Opin Immunol* 1997;9:107-13.
- (137) MacDonald N, De la Rosa A, Benedict MA, Freije JM, Krutsch H, Steeg PS. A serine phosphorylation of Nm23, and not its nucleoside diphosphate kinase activity, correlates with suppression of tumor metastatic potential. *J Biol Chem* 1993;268:25780-9.
- (138) Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin. Cancer Biol.* 1992:65-71.
- (139) Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res.* 1990;1:6130-8.
- (140) Steeg P. Search for metastasis suppressor genes. *Invasion Metastasis* 1989;9:351-9.
- (141) Liteplo R, Frost P, Kerbel RS. Genetic and epigenetic aspects of tumor progression and tumor heterogeneity. *Basic Life Sci* 1985;33:285-305.
- (142) Sager R. Expression genetics in cancer: shifting the focus from DNA to RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:952-5.
- (143) Welch D, Goldberg SF. Molecular mechanisms controlling human melanoma progression and metastasis. *Pathobiology* 1997;65:311-30.
- (144) Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 1990;18:7213-8.
- (145) Board M, Newsholm EA. Maximum activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle in normal, neoplastic and suppressed cells. *Biochem J* 1990;265:503-9.
- (146) Miles L, Dahlberg CM, Plescia J, Felez J, Kato K, Plow EF. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry* 1991;30:1682-91.
- (147) Wu W, Tang X, Hu W, Lotan R, Hong WK, Mao L. Identification and validation of metastasis-associated proteins in head and neck cancer cell lines by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Clin Exper Met* 2002;19:319-26.
- (148) Liepinsh E, Trexler M, Kaikkonen A, Weigelt J, Banyai L, Patthy L, Otting G. NMR structure of the LCCL domain and implications for DFNA9 deafness disorder. *EMBO J* 2001;20:5347-53.
- (149) Saaristo A, Karpanen T, Alitalo K. Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis. *Oncogene* 2000;19:6122-9.
- (150) Rofstad E, Danielsen T. Hypoxia-induced metastasis of human melanoma cells: involvement of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Br J Cancer* 1999;80:1697-707.
- (151) Miao H, Klagsbrun M. Neuropilin is a mediator of angiogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews* 2000;19:29-37.
- (152) Kobuke K, Furukawa Y, Sugai M, Tanigaki K, Ohashi N, Matsumori A, Sasayama S, Honjo T, Tashiro K. ESDN, a novel neuropilin-like membrane protein cloned from

- vascular cells with the longest secretory signal sequence among eukaryotes, is up-regulated after vascular injury. *J Biol Chem* 2001;276:34105-14.
- (153) Koshikawa K, Osada H, Kozaki K, Konishi H, Masuda A, Tatematsu Y, Mitsudomi T, Nakao A, Takahashi T. Significant up-regulation of a novel gene, CLCP1, in a highly metastatic lung cancer subline as well as in lung cancers in vivo. *Oncogene* 2002;21:2822-8.
- (154) Shi B, Vinyals A, Alia P, Chen F, Llorens A, Adrover M, Price JE, Fabra A. Differential expression of MHC Class II molecules in highly metastatic cells is mediated by silencing CIITA transcription. *Cancer Res* 2003:en prensa.
- (155) Wei M, Karavanova I, Ivanov SV, Popescu NC, Keck CL, Pack S, Eisen JA, Lerman MI. In silico-initiated cloning and molecular characterization of a novel human member of the L1 gene family of neural cell adhesion molecules. *Human Genetics* 1998;103:355-64.
- (156) Holm J, Hillenbrand R, Steuber V, Bartsch U, Moos M, Lubbert H, Montag D, Schachner M. Structural features of a close homologue of L1 (CHL1) in the mouse: a new member of the L1 family of neural recognition molecules. *Eur J Neurosci* 1996;8:1613-9.
- (157) Angeloni D, Wei MH, Lerman MI. Two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the CALL gene for association studies with IQ. *Psychiatr Genet* 1999;9:165-7.
- (158) Zhang Y, Roslan R, Lang D, Schachner M, Lieberman AR, Anderson PN. Expression of CHL1 and L1 by neurons and glia following sciatic nerve and dorsal root injury. *Mol Cell Neurosci* 2000;16:71-86.
- (159) Cavallaro U, Niedermeyer J, Fuxa M, Christofori G. N-CAM modulates tumour-cell adhesion to matrix by inducing FGF-receptor signalling. *Nat Cell Biol* 2001;3:E157-E9.
- (160) Walter W, Lingnau K, Schmitt E, Loos M, Maeurer MJ. MHC class II antigen presentation pathway in murine tumours: tumour evasion from immunosurveillance? *Br J Cancer* 2000;83:1192-201.
- (161) Hollingsworth S, Darling D, Gaken J, Hirst W, Patel P, Kuiper M, Towner P, Humphreys S, Farzaneh F, Mufti GJ. The effect of combined expression of interleukin 2 and interleukin 4 on the tumorigenicity and treatment of B16F10 melanoma. *Br J Cancer* 1996;74:6-15.
- (162) Sartoris S, Valle MT, Barbaro AL, Tosi G, Cestari T, D'Agostino A, Megiovanni AM, Manca F, Accolla RS. HLA class II expression in uninducible hepatocarcinoma cells after transfection of AIR-1 gene product CIITA: acquisition of antigen processing and presentation capacity. *J Immunol* 1998;161:814-20.
- (163) Warabi M, Kitagawa M, Hirokawa K. Loss of MHC class II expression is associated with a decrease of tumor-infiltrating T cells and an increase of metastatic potential of colorectal cancer: immunohistological and histopathological analyses as compared with normal colonic mucosa and adenomas. *Pathol Res Pract* 2000;196:807-15.
- (164) Garrido F, Ruiz-Cabello F. MHC expression on human tumors--its relevance for local tumor growth and metastasis. *Semin Cancer Biol* 1991;2:3-10.
- (165) McKenna S, Spyrapopoulos L, Moraes T, Pastushok L, Ptak C, Xiao W, Ellison MJ. Noncovalent interaction between ubiquitin and the human DNA repair protein Mms2 is required for Ubc13-mediated polyubiquitination. *J Biol Chem* 2001;276:40120-6.
- (166) Sancho E, Vila MR, Sanchez-Pulido L, Lozano JJ, Paciucci R, Nadal M, Fox M, Harvey C, Bercovich B, Loukili N, Ciechanover A, Lin SL, Sanz F, Estivill X, Valencia A, Thomson TM. Role of UEV-1, an inactive variant of the E2 ubiquitin-conjugating enzymes, in in vitro differentiation and cell cycle behavior of HT-29-M6 intestinal mucosecretory cells. *Mol Cell Biol* 1998;18:576-9.
- (167) Thomson T, Khalid H, Lozano JJ, Sancho E, Arino J. Role of UEV-1A, a homologue of the tumor suppressor protein TSG101, in protection from DNA damage. *FEBS Lett* 1998;423:49-52.
- (168) Wigle J, Demchyshyn L, Pratt MA, Staines WA, Salih M, Tuana BS. Molecular cloning, expression, and chromosomal assignment of sarcolemmal-associated proteins. A family of acidic amphipathic alpha-helical proteins associated with the membrane. *J Biol Chem* 1997;272:32384-94.

- (169) Wielowieyski P, Sevinc S, Guzzo R, Salih M, Wigle JT, Tuana BS. Alternative splicing, expression, and genomic structure of the 3' region of the gene encoding the sarcolemmal-associated proteins (SLAPs) defines a novel class of coiled-coil tail-anchored membrane proteins. *J Biol Chem* 2000;275:38474-81.
- (170) Munshi R, Kandl KA, Carr-Schmid A, Whitacre JL, Adams AE, Kinzy TG. Overexpression of translation elongation factor 1A affects the organization and function of the actin cytoskeleton in yeast. *Genetics* 2001;157:1425-36.
- (171) Clemens M, Bommer UA. Translational control: the cancer connection. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:1-23.
- (172) Yang Y, Hanke JH, Carayannopoulos L, Craft CM, Capra JD, Tucker PW. NonO, a non-POU-domain-containing, octamer-binding protein, is the mammalian homolog of *Drosophila nonAdiss*. *Mol Cell Biol* 1993;13:5593-603.
- (173) Shav-Tal Y, Zipori D. PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins. *FEBS Lett* 2002;531:109-14.
- (174) Clark J, Lu YJ, Sidhar SK, Parker C, Gill S, Smedley D, Hamoudi R, Linehan WM, Shipley J, Cooper CS. Fusion of splicing factor genes PSF and NonO (p54nrb) to the TFE3 gene in papillary renal cell carcinoma. *Oncogene* 1997;15:2233-9.
- (175) Karhumaa P, Parkkila S, Waheed A, Parkkila AK, Kaunisto K, Tucker PW, Huang CJ, Sly WS, Rajaniemi H. Nuclear NonO/p54(nrb) protein is a nonclassical carbonic anhydrase. *J Biol Chem* 2000;275:16044-9.
- (176) Sato N, Funayama N, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. *J Cell Sci* 1992;103:131-43.
- (177) Yang J, Brown MS, Ho YK, Goldstein JL. Three different rearrangements in a single intron truncate sterol regulatory element binding protein-2 and produce sterol-resistant phenotype in three cell lines. *J Biol Chem* 1995;270:12152-61.
- (178) Maul R, Chang DD. EPLIN, epithelial protein lost in neoplasm. *Oncogene* 1999;18:7838-41.
- (179) Maul R, Sachi Gerbin C, Chang DD. Characterization of mouse epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN) and comparison of mammalian and zebrafish EPLIN. *Gene* 2001;262:155-60.
- (180) Chen S, Maul RS, Kim HR, Chang DD. Characterization of the human EPLIN (Epithelial Protein Lost In Neoplasm) gene reveals distinct promoters for the two EPLIN isoforms. *Gene* 2000;248:69-76.
- (181) Song Y, Maul RS, Gerbin CS, Chang DD. Inhibition of anchorage-independent growth of transformed NIH3T3 cells by epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN) requires localization of EPLIN to actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 2002;13:1408-16.
- (182) Richardson P, Zon LI. Molecular cloning of a cDNA with a novel domain present in the *tre-2* oncogene and the yeast cell cycle regulators *BUB2* and *cdc16*. *Oncogene* 1995;11:1139-48.
- (183) White R, Pasztor LM, Richardson PM, Zon LI. The gene encoding TBC1D1 with homology to the *tre-2/USP6* oncogene, *BUB2*, and *cdc16* maps to mouse chromosome 5 and human chromosome 4. *Cytogenet Cell Genet* 2000;89:272-5.
- (184) Otsuki M, Fukami K, Kohno T, Yokota J, Takenawa T. Identification and characterization of a new phospholipase C-like protein, PLC-L(2). *Biochem Biophys Res Commun* 1999;266:97-103.
- (185) Hughes E, Cresswell P. The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex. *Curr Biol* 1998;8:709-12.
- (186) Kang S, Cresswell P. Calnexin, Calreticulin, and ERp57 Cooperate in Disulfide Bond Formation in Human CD1d Heavy Chain. *J Biol Chem* 2002;277:44838-44.
- (187) Hirano N, Shibasaki F, Sakai R, Tanaka T, Nishida J, Yazaki Y, Takenawa T, Hirai H. Molecular cloning of the human glucose-regulated protein ERp57/GRP58, a thiol-dependent reductase. Identification of its secretory form and inducible expression by the oncogenic transformation. *Eur J Biochem* 1995;234:336-42.
- (188) Kaplitt M, Kleopoulos SP, Pfaff DW, Mobbs CV. Estrogen increases HIP-70/PLC-alpha messenger ribonucleic acid in the rat uterus and hypothalamus. *Endocrinology* 1993;133:99-104.

- (189) Elliott B, Hung WL, Boag AH, Yuck AB. The role of hepatocyte growth factor (scatter factor) in epithelial-mesenchymal transition and breast cancer. *Can J Physiol Pharmacol* 2002;80:91-102.
- (190) Scaloni A, Jones W, Pospischil M, Sassa S, Schneewind O, Popowicz AM, Bossa F, Graziano SL, Manning JM. Deficiency of acylpeptide hydrolase in small-cell lung carcinoma cell lines. *J Lab Clin Med* 1992;120:546-52.
- (191) Erlandsson R, Boldog F, Persson B, Zabarovsky ER, Allikmets RL, Sumegi J, Klein G, Jornvall H. The gene from the short arm of chromosome 3, at D3F15S2, frequently deleted in renal cell carcinoma, encodes acylpeptide hydrolase. *Oncogene* 1991;6:1293-5.
- (192) Oshumi T, Ichimura T, Sugano H, Omata S, Isobe T, Kuwano R. Ribosome-binding protein p34 is a member of the leucine-rich-repeat-protein superfamily. *Biochem J* 1993;294:465-72.
- (193) Skjerpen C, Wesche J, Olsnes S. Identification of ribosome-binding protein p34 as an intracellular protein that binds acidic fibroblast growth factor. *J Biol Chem* 2002;277:23864-71.
- (194) Collum R, Brutsaert S, Lee G, Schindler C. A Stat3-interacting protein (StIP1) regulates cytokine signal transduction. *PNAS* 2000;97:10120-5.
- (195) Poyner D, Sexton PM, Marshall I, Smith DM, Quirion R, Born W, Muff R, Fischer JA, Foord SM. International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol Rev* 2002;54:233-46.
- (196) Kitamuro T, Takahashi K, Totsune K, Nakayama M, Murakami O, Hida W, Shirato K, Shibahara S. Differential expression of adrenomedullin and its receptor component, receptor activity modifying protein (RAMP) 2 during hypoxia in cultured human neuroblastoma cells. *Peptides* 2001;22:1795-801.
- (197) Nagasaki K, Maass N, Manabe T, Hanzawa H, Tsukada T, Kikuchi K, Yamaguchi K. Identification of a novel gene, DAM1, amplified at chromosome 1p13.3-21 region in human breast cancer cell lines. *Cancer Lett* 1999;140:219-26.
- (198) Maass N, Rosel F, Schem C, Hitomi J, Jonat W, Nagasaki K. Amplification of the BCAS2 gene at chromosome 1p13.3-21 in human primary breast cancer. *Cancer Letters* 2002;185:219-23.
- (199) Llorens A, Vinyals A, Alía P, López-Barcons LI, González-Garrigues M, Fabra A. Metastatic ability of MXT mouse mammary Subpopulations correlates with clonal expression and/or membrane association of gelatinase A. *Molecular Carcinogenesis* 1997;19:54-66.
- (200) Beutler A, Banck MS, Wedekind D, Hedrich HJ. Tumor gene therapy made easy: allogeneic major histocompatibility complex in the C6 rat glioma model. *Hum Gene Ther* 1999;10:95-101.