

TESI DOCTORAL

**IDENTIFICACIÓN
Y CARACTERIZACIÓN DE
NUEVOS GENES IMPLICADOS
EN EL DESARROLLO DEL
CÁNCER DE PRÓSTATA**

PATRICIA BENEDIT HERNÁNDEZ

MARZO 2002

Abreviaturas	7
--------------	---

INTRODUCCIÓN

<i>I. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DE LA PRÓSTATA</i>	8
Desarrollo prostático normal	8
Subdivisiones anatómicas	9
Histología de la próstata	10
<i>II. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA</i>	11
<i>III. ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA</i>	12
<i>IV. HISTORIA NATURAL DEL CÁNCER DE PRÓSTATA</i>	16
IV.1 Carcinoma de próstata. Lesiones precursoras	16
- Hiperplasia adenomatosa atípica (AAH)	16
- Neoplasia intraepitelial prostática (PIN)	16
IV.2 Progresión del cáncer de próstata a estadios invasivos y metastásicos	19
<i>V. ESTADIO CLÍNICO Y GRADO HISTOLÓGICO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA</i>	19
V.1 Estadiaje clínico	19
V.2 Grado histológico	21
<i>VI. DIAGNÓSTICO PRECOZ DEL CÁNCER DE PRÓSTATA</i>	23
PSA. Características clínicas y moleculares	23
<i>VII. CARCINOMA ENDOCRINO</i>	24
Receptor de andrógenos. Características moleculares	25
<i>VIII. ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA PROGRESIÓN TUMORAL. GENES Y MARCADORES TUMORALES DEL CÁNCER DE PRÓSTATA</i>	27
VIII.1 Aberraciones cromosómicas en cáncer de próstata	
Detección y significado biológico	27

VIII.2 Alteraciones moleculares. Búsqueda de nuevos genes implicados	
en el desarrollo tumoral	32
I. Regulación del ciclo celular	35
II. Genes supresores de tumor	36
III. Factores de transcripción	37
IV. Citoquinas y factores de crecimiento	39
V. Adhesión celular	42
VI. Proteínas de membrana	43
VII. Actividad telomerasa	43

OBJETIVOS

OBJETIVO DE LA TESIS	45
-----------------------------	----

MATERIAL Y MÉTODOS

I. MUESTRAS	46
Muestras prostáticas – tejido congelado	47
II. EXTRACCIÓN DE RNA	48
II.1 RNA total	48
II.2 RNA mensajero	49
III. SÍNTESIS DE cDNA POR TRANSCRIPCIÓN INVERSA	50
IV. RNA-BASED ARBITRARILY-PRIMED PCR	50
IV.1 Técnica de RAP	50
IV.2 Aislamiento y caracterización inicial de las bandas del RAP	51
IV.3 Subclonaje de las bandas del RAP	53
Ligación	53
Transformación (kit de Invitrogen)	53
V. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA	54

V.1 Vectores utilizados	54
V.2 Transformación por electroporación	54
V.2.a Preparación de células competentes	54
V.2.b Transformación	54
V.3 Detección de colonias portadoras del inserto. PCR de comprobación	54
V.4 Purificación del DNA plasmídico	55
VI. SECUENCIACIÓN	56
VII. RT-PCR SEMICUANTITATIVA	57
VII.1 Diseño de oligonucleótidos	57
VII.2 Normalización de la técnica de RT-PCR SQ	57
VIII. FISH (Localización cromosómica)	59
IX. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA EXÓN / INTRÓN DE PTOVI	59
X. NORTHERN BLOTTING	60
X.1 Preparación de la muestra	60
X.2 Preparación del gel de agarosa	60
X.3 Transferencia a membrana	60
X.4 Marcaje de la sonda	61
X.5 Hibridación	61
XI. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES	62
XI.1 Diseño de péptidos e inoculación en conejos	62
XI.2 ELISA	62
XI.3 Purificación de anticuerpo	63
XI.4 Anticuerpos utilizados	64
XII. WESTERN BLOTTING	65
XII.1 Extracción de proteínas	65
Inhibidores de proteasas	
XII.1.a Extracción de proteína total	65
i. Tampón Laemmli	65
ii. Tampón RIPA	66

i. Extracción de fracción proteica soluble	66
ii. Extracción de fracción proteica insoluble	67
XII.2 Preparación del gel y transferencia	67
XII.3 Desondación de la membrana de western	68
XIII. INMUNOHISTOQUÍMICA	69
XIV. INMUNOCITOQUÍMICA	69
XV. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA	70
XVI. AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS INSOLUBLES EN TRITÓN	
DE BAJA DENSIDAD	71
XVI.1 Mediante gradiente de sacarosa	71
XV.2 Mediante gradiente de densidad (<i>Optiprep</i>)	71
XVII. INMUNOPRECIPITACIÓN	70
XVIII. DOBLE HÍBRIDO	73
XVIII.1 Fundamento del sistema del doble híbrido	73
XVIII.2 Células competentes	75
XVIII.3 Transformación de levadura	75
XVIII.4 Selección de positivos	76
XVIII.5 Aislamiento de la colonia positiva	76
XVIII.6 Extracción de DNA plasmídico de levadura	77
 RESULTADOS	
I. BANDAS DIFERENCIALES SELECCIONADAS	78
II. PTOVI	80
A) Un transcrito sobreexpresado en cáncer de próstata	80
B) PTOVI define una nueva familia de proteínas	82
C) El gen PTOVI	85
D) El gen PTOV2	88
E) Distribución de la expresión de PTOVI en tejido normal	92

F) Regulación androgénica e los niveles de expresión de PTOV1	92
G) Proteína PTOV1	93
H) Expresión de la proteína PTOV1 en tumores prostáticos	96
I) Cambio de localización de PTOV1 en las diferentes etapas del ciclo celular	103
J) Otros aspectos de la expresión de PTOV1 en el tejido prostático	108
PTOV1 en células neuroendocrinas	109
PTOV1 en endotelio y eritrocitos	109
K) Búsqueda de interacciones de PTOV1 con otras proteínas celulares	110
Clon 149	113
Clon 10.3 (Flotilina 1)	114
Clon 87.2 (Anexina 1)	115
Clon 170.3 (RACK1)	117
Clon 113.2 (eIF3ε)	119
Clon 37.6 (BAT4)	120
Clon 189.2 (KIAA0804)	121
Clon 185.2 (PSMB4)	123
L) Comprobación de las interacciones de los clones obtenidos por YTH	125
Distribución de RACK1, Flotilina 1 y Anexina 1 en líneas celulares	125
Coinmunolocalización en las líneas celulares PC3 y PZHPV7	126
Coinmunopurificación en la fracción insoluble en Tritón X-100	129
M) Inmunoprecipitación de la proteína PTOV1	132
N) Proteína recombinante de PTOV1	133
II. EMT	133
A) Comprobación semicuantitativa de los niveles de expresión de EMT en tejido prostático normal y tumoral	135
B) Comparación de la expresión de EMT entre ZBP y ZT de próstatas normales	137
C) Distribución de la expresión de EMT en tejido normal	138
D) Expresión de EMT en líneas tumorales	138
E) Proteína EMT	139
F) Localización celular. Inmunohistoquímica	141

DISCUSIÓN

El gen PTOVI142
El gen EMT157
Estudio del patrón de expresión diferencial entre dos muestras de próstata159

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES162

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA164

Abreviaturas

AAH: hiperplasia adenomatosa atípica
AJCC: *American Joint Committee on Cancer*
AR: receptor de andrógenos
ARE: elemento de respuesta a andrógenos
CDKs: quinasas dependientes de ciclina
CGH: hibridación genómica comparada
CP: cáncer de próstata
CZ: zona central de la próstata
DD: *differential display*
EGF: factor de crecimiento epidérmico
eIF3: factor de inicio de traducción de eucariotas
EMT: Transportador de monoaminas extraneuronal
FAK: proteínas quinasas de adhesión focal
FGF: factor de crecimiento de fibroblastos
FISH: hibridación in situ con fluorescencia
fm: estroma anterior fibromuscular
GFP: proteína de fluorescencia verde
HBP: hiperplasia benigna de próstata
HSPs: *heat-shock proteins*
IGF: *insuline growth factor*
IGF-1: *insulin-like growth factor 1*
LOH: pérdida de heterocigosidad
NSE: enolasa específica de neurona
PAP: fosfatasa ácida prostática
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PIN: neoplasia intraepitelial prostática
PPS: esfínter pre-prostático
PSA: antígeno específico de próstata
PSCA: *prostate stem cell antigen*
PSMA: antígeno de membrana específico de próstata
PTOV1: *prostate tumor overexpressed 1*
PUG: glándulas periuretrales
PZ: zona periférica de la próstata
RB1: gen del retinoblastoma
RDA: *representational difference analysis*
SHBG: *sex hormone binding globulin*
TGF: *factor de crecimiento transformante*
TNM : sistema de estadiaje clínico tumor-nódulo-metástasis
TZ: zona de transición de la próstata
UICC: *Union Internationale Contre le Cancer*
UTR: región no traducida
VACURG: *Veterans Administration Co-operative Urological Research Group*
VDR: receptor de la vitamina D
VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular
ZBP: zona benigna periférica de la próstata

I. ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DE LA PRÓSTATA

La próstata es un órgano glandular fibromuscular que en condiciones normales pesa aproximadamente 20 gr. Está localizada en el suelo pélvico, debajo de la vejiga urinaria. La uretra la atraviesa longitudinalmente y es esta la razón por la que cualquier crecimiento producido en este órgano, se traduce frecuentemente en una obstrucción urinaria que origina el síndrome de prostatismo.

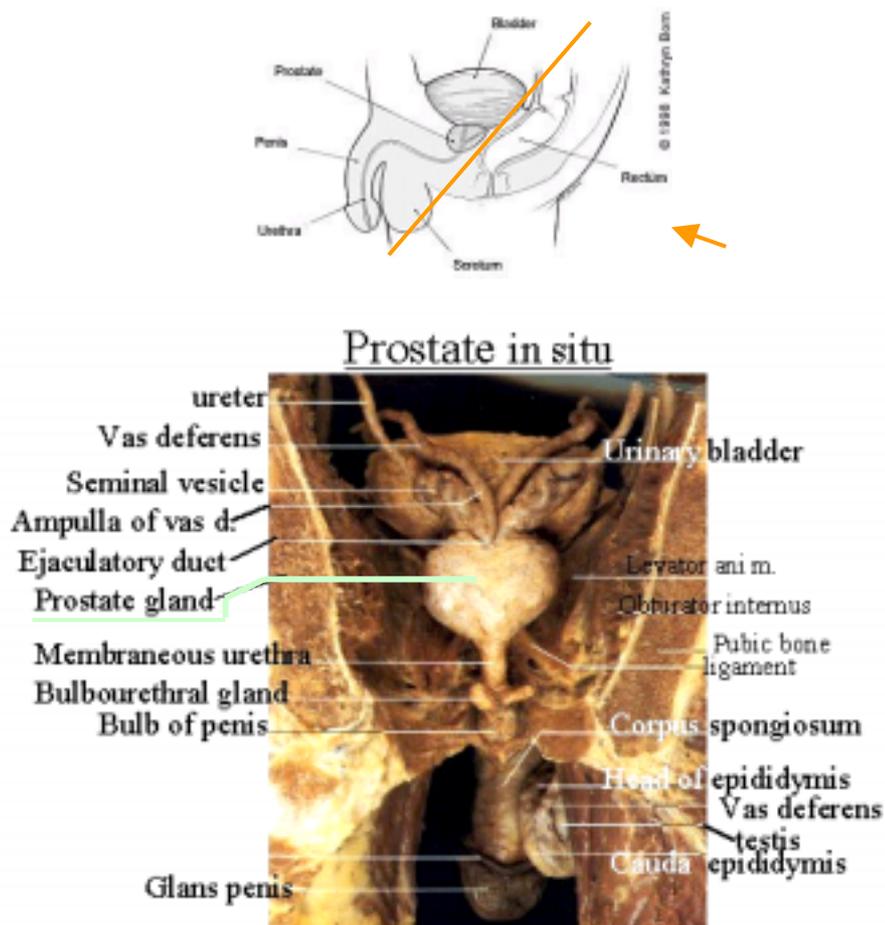


Figura 1. Imagen en la que se detalla la localización de la glándula prostática. Las flechas en naranja indican el corte en el plano y la visualización desde la cara posterior que se observa en la imagen inferior.

La próstata inicia su desarrollo en la séptima semana de la embriogénesis, a partir del mesénquima situado en la porción inferior y posterior del seno urogenital alrededor de la desembocadura del conducto de Wolf. En el caso de la hembra, el vestigio embriológico de este

órgano corresponde a las glándulas periuretrales de Skene y en el caso de la diferenciación masculina, mediada por la acción de los andrógenos, se desarrolla la glándula prostática. La zona mesenquimal situada por encima del conducto wolfiano dará lugar a la próstata craneal en la que habitualmente se desarrolla la hiperplasia benigna de próstata (HBP) a partir de los 40-45 años. Por el contrario, de la zona mesenquimal inferior al conducto de Wolf derivará la zona caudal de la próstata, en la cual se originarán alrededor del 80% de los carcinomas prostáticos (CP).

Durante el desarrollo embrionario existe una interacción importante entre las células mesenquimales y las epiteliales, ya que la morfogénesis epitelial prostática inducida por andrógenos, así como su crecimiento y su diferenciación secretora, se producen por mediación de factores tróficos que provienen de las células mesenquimales que son positivas para el receptor de andrógenos.

Desde el punto de vista anatómico, la próstata puede diferenciarse en tres zonas: la zona periférica (PZ), central (CZ) y de transición (TZ).

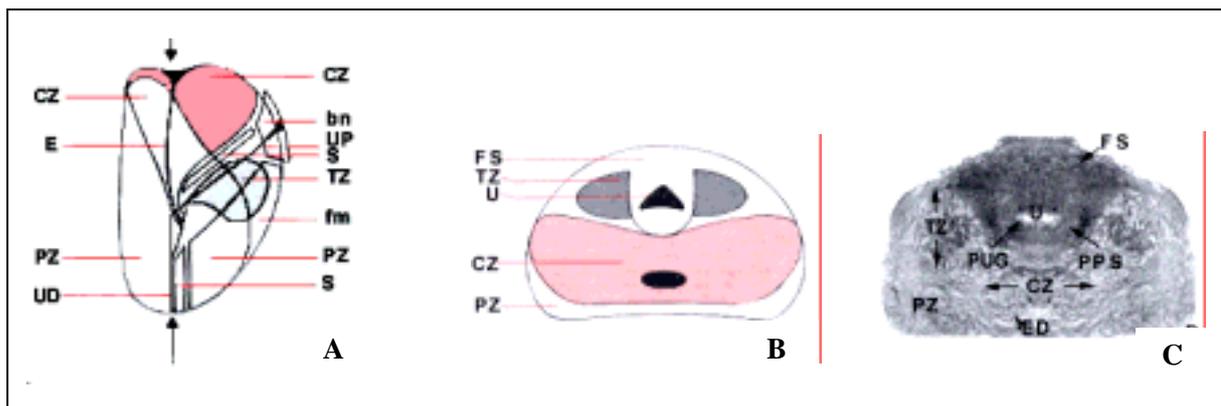


Figura 2. Anatomía de la próstata. **A)** Corte sagital de la próstata. **B y C)** Corte transversal. Zona central (CZ), zona periférica (PZ), zona de transición (TZ), uretra distal (UD), uretra proximal (UP), Conductos eyaculadores (ED, E), esfínter prostático (S), estroma fibromuscular (fm), cuello vesical (bn), uretra (U), glándula periuretral (PUG), esfínter preprostático (PPS).

La PZ es la subdivisión anatómica de mayor tamaño. Compuesta por tejido secretor, contiene un 75% del tejido glandular. Corresponde a la región donde acostumbra a desarrollarse la neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y el carcinoma de próstata (CP).

La CZ, que representa aproximadamente el 25% de la masa glandular total de la próstata, se encuentra envolviendo a los conductos eyaculadores. Se diferencia de la zona periférica y de transición por sus características glandulares tanto morfológicas como histológicas. Presenta una longitud de sus conductos mayor que el resto de las áreas y el citoplasma de las células secretoras es mucho más

granular y oscuro. Los núcleos son relativamente más largos y dispuestos a diferente altura en las distintas células que componen la glándula. (McNeal, 1968). Debido a que sus características se asemejan más a las vesículas seminales se ha sugerido que su origen sea tal vez a partir del conducto Wolfiano.

La TZ, corresponde al 5% restante de la próstata, está formada por un pequeño conjunto de conductos que proceden de un mismo punto en la unión entre los segmentos proximal y distal de la uretra. Es la principal región donde se origina la hiperplasia benigna de próstata (HBP).

Existen otros dos compartimentos que constituyen también el órgano prostático. El estroma anterior fibromuscular (fm) y el esfínter pre-prostático (PPS). El estroma anterior fibromuscular es una gruesa capa de tejido conectivo que cubre por entero la cara anterior de la próstata y que rodea la porción de uretra próxima al cuello vesical. El esfínter pre-prostático es una zona pequeña pero a su vez bastante compleja que actúa como esfínter en el momento de la eyaculación, evitando el reflujó del fluido seminal hacia la vejiga. Su principal componente es un esfínter cilíndrico de musculatura lisa alrededor de la uretra pre-prostática. Dentro de este cilindro se encuentran las minúsculas glándulas periuretrales (PUG) que representan menos del 1% de la masa glandular prostática pero en las que también se origina la hiperplasia benigna de próstata.

Desde el punto de vista histológico, la glándula prostática está constituida por un componente glandular y otro no glandular ambos fusionados y contenidos dentro de la cápsula prostática. La estrecha conexión entre estos componentes dificulta e incluso imposibilita la disección separada de ambos.

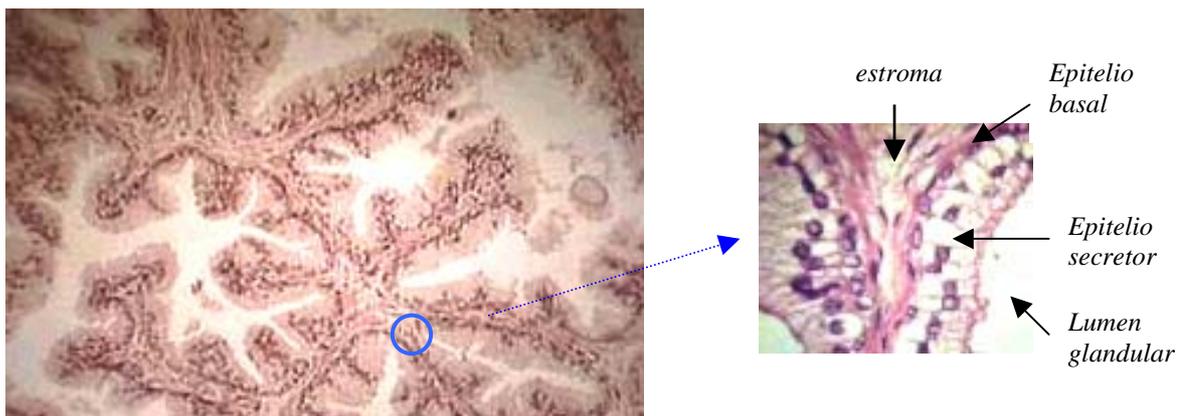


Figura 3. Corte histológico de la glándula prostática.

El componente glandular está constituido por los acinos y conductos prostáticos que están formados por un epitelio glandular que consiste en dos compartimentos histológicamente definidos, el basal y el secretor. Estos acinos y conductos están sumergidos en una matriz tisular de estroma, tejido

fibromuscular, vascular y conectivo. En el estroma encontramos principalmente dos tipos celulares, los miofibroblastos (positivos para vimentina y actina) y las células musculares lisas (positivas para miosina y desmina). La estrecha interconexión existente entre estroma y epitelio es necesaria para el correcto desarrollo y funcionamiento de la próstata (Farnsworth , 1999; Condon y Bosland, 1999).

El compartimento basal del epitelio glandular está constituido por 1 o 2 capas de células basales localizadas entre la membrana basal y la capa de células secretoras. Podemos encontrar desde células basales pequeñas con escaso citoplasma y cromatina condensada hasta células basales con aspecto cuboidal, mayor contenido citoplasmático y un porcentaje de cromatina activa superior. El componente secretor está formado por una capa de células columnares que se proyectan hacia el lumen glandular y su morfología varía dependiendo de la zona prostática. La expresión de ciertas citokeratinas puede ser indicativa del grado de diferenciación de las células epiteliales. En la gándula prostática, las células basales expresan las citokeratinas 5, 14 y 15 a diferencia de las células secretoras que expresan las citokeratinas 8 y 18 que son características de epitelios simples. Por este motivo, el análisis de estas distintas citokeratinas se ha utilizado en el estudio del proceso evolutivo del cáncer de próstata (Alberti y cols,2000; Wolff y cols,1999). Otras diferencias que existen entre ambas poblaciones es que únicamente se detecta expresión del antígeno específico de próstata (PSA) y de la fosfatasa ácida (PAP) en las células epiteliales secretoras (Grignon y cols,1988). En ambas se detecta expresión del receptor de andrógenos (AR), aunque los niveles de este son significativamente superiores en la población de células secretoras.

Existen evidencias basadas en el patrón de expresión de citokeratinas y en la vida media y capacidad de proliferación celular que sugieren que en la monocapa de células basales residiría la población de *stem cells* (o células pluripotenciales) que daría origen a las poblaciones de células secretoras y células basales. Ambos tipos celulares pertenecerían a la misma estirpe celular y se distinguirían entre si por su grado de diferenciación celular, desde no diferenciado (células basales) hasta diferenciado (células secretoras). También se han encontrado células prostáticas que presentan características fenotípicas intermedias entre las células basales y las secretoras (Myers y Grizzle, 1997; Van Leenders y cols,2000) sería la población de células con una diferenciación intermedia (Yang y cols,1997; Verhagen y cols,1992).

En todas las zonas de la próstata, el epitelio glandular contiene una pequeña población de células neuroendocrinas que se localizan sobre la capa de células basales dispuestas aleatoriamente entre las células secretoras. Normalmente no llegan hasta el lumen glandular, pero a veces presentan unas estrechas extensiones que lo alcanzan. También es característico de estas células la presencia de procesos dendríticos que se extienden lateralmente. El único método de identificación de estas células es mediante técnicas inmunohistoquímicas. Estas células son ricas en gránulos de serotonina y NSE (*neuron specific enolase*). Existen subpoblaciones de células neuroendocrinas que también contienen

una variedad de hormonas peptídicas como son la somatostatina, calcitonina y bombesina. Pese a la asociación observada, su implicación en el desarrollo prostático así como en sus patologías es desconocida. Podría presentar una función paracrina, tal vez en respuesta a estímulos neuronales. Esta pequeña población celular puede originar, ocasionalmente, carcinomas negativos para el antígeno específico de próstata (PSA) y para la fosfatasa ácida (PAP) (di Sant' Agnese, 2000; Aprikian y cols,1998; Abrahamsson, 1999).

II. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA.

El cáncer de próstata no fue considerado como una neoplasia frecuente hasta que en 1902, Albarrán y Hallé observaron una elevada frecuencia de los denominados "epiteliomas adenoides" en los especímenes quirúrgicos de las prostatectomías. La distribución zonal de la glándula prostática y su transcendencia en el desarrollo del cáncer de próstata, claramente establecida por Gil Vernet en la década de los 50, sirvió posteriormente a McNeal en sus estudios sobre la anatomía zonal de la próstata, ampliamente conocidos en el campo de la patología prostática.

En la actualidad, el cáncer de próstata se sitúa entre las 5 neoplasias más frecuentes que afectan a la población mundial y destaca entre ellas por tres razones fundamentales: el brusco incremento en su incidencia presentado en los últimos años, así como por ser la neoplasia más común en la población masculina y la segunda causa oncológica de muerte en los países occidentales (Woolf, 1995). El incremento en la incidencia de esta neoplasia surge a su vez de la interacción entre dos factores: el aumento de la longevidad masculina y los avances desarrollados en el campo del diagnóstico precoz. Debido a estos avances, en la última década se ha observado una disminución significativa de la mortalidad por cáncer (Levi y cols,2000).

En la década de los 90, el cáncer de próstata se ha convertido en uno de los principales problemas de la población industrializada. En EEUU, se ha estimado que uno de cada 8 individuos desarrollará cáncer de próstata a lo largo de su vida (Ries y cols,1999). En la Unión Europea, corresponde al segundo tipo de cáncer más común, con 134865 casos nuevos y 55704 muertes en 1996 (Ferlay y cols,1999). La incidencia del cáncer de próstata ha aumentado notablemente durante los últimos 20 años. En EEUU entre 1980 y 1988 aumentó un 35% (de 80 a 105 por cada 100000 individuos) (Ries y cols,1999) con un aumento de un 2.5% en la mortalidad y en 1992 aumentó un 20% más (179 por cada 100000 caucásicos y 250 por cada 100000 afroamericanos) (Hankey y cols,1999). El aumento de la incidencia se ha visto acompañado, a partir de los años 90 por una disminución de la mortalidad. La disminución de la mortalidad puede ser explicada por la utilización sistemática del PSA (detección de los niveles séricos del antígeno específico de próstata, PSA) como método de diagnóstico. En USA se ha observado una disminución de un 6.7% en el índice de mortalidad entre los años 1991-1995 (Ries y

cols,1999) y se ha estimado que un individuo de 55 años tiene un 3% de riesgo de fallecimiento por cáncer de próstata. Al igual que todos los carcinomas, el riesgo de cáncer de próstata está estrechamente asociado con la edad del individuo. También las características demográficas son un factor de variación en la incidencia (Parkin, 1992). Entre 1988 y 1992 la mayor incidencia se encontró en la población afroamericana (137/100000) y la caucásica americana (100.8/100000), seguida de la escandinava (31-55/100000) (Ferlay y cols,1997). Las áreas de menor incidencia se encuentran en el este de Asia (2/100000 individuos en Shangai) (Parkin, 1992). La variación en la incidencia observada ya sea entre las distintas poblaciones, o en una misma población a lo largo de los años puede ser debida a un aumento en la utilización de los sistemas de detección (PSA) (Shimizu y cols,1991). Por este motivo, la utilización del sistema PSA dificulta la determinación real de la incidencia de esta patología en el mundo.

III. ETIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA.

La etiología del cáncer de próstata no es del todo clara. Hasta el momento los aspectos que se han considerado como factores de riesgo son: la edad del individuo, la producción y metabolismo de los andrógenos, el área geográfica/etnia, el hábito dietético y la historia familiar.

Edad: existe una correlación entre el aumento de la edad del individuo y el riesgo de padecer cáncer de próstata. En EEUU la mortalidad debida a esta patología a partir de los 85 años es de 629 / 100.000 individuos por año, cifra significativamente superior a la correspondiente al cáncer de pulmón, que es el segundo tipo de cáncer más común y cuya mortalidad es de 435 / 100.000 individuos por año. Otro hecho es que el cáncer de próstata latente, no detectado clínicamente, es una lesión muy frecuente. (CIS cancer information service, NCI).

Los estudios realizados en necropsias han demostrado que existe una desproporción entre la incidencia histológica y clínica del CP. Existe un porcentaje de varones, aparentemente sanos, portadores de CP pero en los cuales la causa de muerte ha sido otra. El carcinoma latente generalmente se identifica en estudios post-mortem o a partir de próstatas extraídas quirúrgicamente cuando aparentaban una enfermedad benigna o bien sospechados por una elevación sérica de PSA y demostrados a través de la biopsia ecodirigida. Por definición, el CP latente es pequeño, normalmente bien diferenciado y clínicamente asintomático. El carcinoma latente puede encontrarse en pacientes a partir de los 30 años de edad y se ha detectado en un 30 % de individuos de 50 años de edad y en un 80% de los individuos de 80 años de edad, tras haberles realizado estudios post-mortem (Schroder, 1995). Se estima que tan sólo alrededor del 20% de todos los CP existentes en el varón darán sintomatología clínica, por lo que parte del problema existente a la hora de detectar el CP es

consecuencia de la presencia de esta forma latente, la cual prevalece por igual en el contexto de la población mundial (Breslow y cols,1977).

Andrógenos: los andrógenos son necesarios para el crecimiento, mantenimiento y funcionamiento de la actividad de las células prostáticas y están implicados en el desarrollo del CP. La reducción de sus niveles mediante castración o terapia estrogénica, tiene un efecto paliativo en la enfermedad del CP. De hecho, se ha observado que la incidencia de CP en individuos cirróticos y en individuos castrados antes de la pubertad es significativamente inferior (Coffey y Walsh, 1990).

Etnia: según se ha explicado en el apartado anterior, las características geográficas son un factor de variación en la incidencia de esta enfermedad. La población afro-americana, entre los 40 y 60 años, presenta una tasa de mortalidad 3 veces superior a la presentada por la población caucásica. El índice de mortalidad más bajo se ha observado en la población asiática (Powell, 1998).

Hábitos dietéticos: a raíz de los estudios realizados en este campo, es evidente que el factor nutricional juega un papel importante en la progresión del cáncer de próstata y podría explicar también la variación geográfica en la incidencia hasta ahora observada. Una alimentación basada en un alto contenido en fibra y un bajo aporte de grasa animal tendría un efecto protector, como es el caso de la dieta vegetariana en Asia. Una alta ingesta de grasas, especialmente ácidos grasos saturados, así como el consumo alto en calorías, han sido directamente relacionados con el riesgo de sufrir CP avanzado (Giovannucci y cols,1993). Una dieta rica en calorías se traduce en un desequilibrio energético y en un incremento del riesgo de obesidad. La obesidad ha sido asociada a su vez con niveles bajos de estrógenos y altos de testosterona. Los niveles de SHBG (*sex hormone binding globulin*, proteína de unión a testosterona) y el ratio entre testosterona y estrona-estradiol decrecen progresivamente a medida que incrementa el índice de masa corporal (Chyou y cols,1994). También se ha demostrado que la restricción de ingesta de energía (grasas, lípidos o carbohidratos) inhibe el crecimiento tumoral y la expresión de VEGF y IGF (Mukherjee y cols,1999).

Las vitaminas A, D y E: se ha postulado que las vitaminas A, D y E podrían actuar como factores protectores (Giovannucci, 1998b; Corder y cols,1993; Fleshner y cols,1999). Existen otros muchos factores asociados con la manifestación de esta patología como son los niveles bajos de zinc, cadmio, exposición a hormonas y factores de crecimiento durante la etapa prenatal (Ekbom y cols,1996). Se ha postulado también que un suplemento de la dieta con selenio podría disminuir el riesgo de cáncer de próstata (Clark y cols,1998).

En relación con la dieta, se han realizado estudios más precisos que focalizan su atención en supuestas sustancias que se encuentran en ciertos alimentos o plantas como es el caso del tomate o la soja y que actuarían como factores estimulantes o inhibidores del evento oncogénico. Se ha descrito que el licopeno, una sustancia que se encuentra en el tomate, disminuye el riesgo de cáncer de próstata, pulmón y estómago (Giovannucci, 1999); los niveles séricos de isoflavonas, concretamente la genisteína que se encuentra en la soja, inhiben el crecimiento celular e inducen apoptosis (Davis y cols,1998; Gann y cols,1999).

Historia familiar: el cáncer de próstata familiar representa un 9% del CP total. Los primeros indicios de una agregación familiar del cáncer de próstata fueron observados por Morganti y col. en 1956 y por Woolf en 1960. Este último observó que la muerte por cáncer de próstata era tres veces superior en los padres e hijos de individuos fallecidos por esta causa que de pacientes fallecidos por causas distintas. Tres décadas después, estudios realizados en familias afectadas sugirieron la existencia de genes susceptibles al desarrollo tumoral (Lichtenstein y cols,1996). El cáncer de próstata se encuentra entre los cuatro carcinomas que presentan un mayor porcentaje de casos con carácter hereditario. Considerando la frecuencia de casos hereditarios, el CP se situaría por debajo del melanoma de piel y el cáncer de ovario y por delante del cáncer de colon y de mama (Cannon y cols,1982). Según un estudio realizado en el hospital Johns Hopkins, en el que se analizaron un total de 691 individuos con cáncer de próstata versus 640 controles y en el que el único factor de riesgo era el historial familiar positivo para dicha patología, el riesgo de padecer cáncer de próstata aumenta entre 5 y 11 veces dependiendo del número de miembros familiares afectados (Steinberg y cols,1990). A partir de ciertos estudios epidemiológicos se ha observado cierta similitud entre la etiología del cáncer de mama y cáncer de próstata. De esta manera, se ha conocido que los genes BRCA1 y BRCA2, responsables del cáncer de mama hereditario, también están asociados al cáncer de próstata (Carter, 2001; Breast Cancer linkage Consortium, 1999).

Entre los factores etiológicos asociados a la manifestación y desarrollo del cáncer de próstata, se encuentran también los *factores moleculares* como son los oncogenes, supresores tumorales, factores de crecimiento (IGF-1), receptor de la vitamina D (VDR) y receptor de andrógenos (AR).

Etiología de la hiperplasia benigna de próstata (HBP): al igual que el cáncer de próstata, está relacionada con la edad del individuo y requiere andrógenos para desarrollarse y crecer. Ambas enfermedades se desarrollan principalmente en perros y humanos a diferencia del resto de especies donde rara vez se observan. A diferencia del cáncer de próstata la HBP es una lesión benigna, que rara vez progresa hacia una neoplasia maligna. Otra disimilitud respecto al CP y PIN es que no existe ninguna evidencia de que HBP sea clonal, sólo se han encontrado algunos cambios genéticos que implican inestabilidad genómica. En HBP no se detectan cambios morfológicos en el núcleo, que son característicos en las neoplasias malignas. La patología hiperplásica con frecuencia presenta crecimientos variables del estroma y se ha sugerido que la secreción de factores de crecimiento por parte del mesénquima podría actuar sobre las células epiteliales adyacentes y contribuir al desarrollo de la hiperplasia de estas últimas (De Marzo y cols,1998b).

IV. HISTORIA NATURAL DEL CARCINOMA DE PRÓSTATA.

IV.1 Carcinoma de próstata. Lesiones precursoras

Las lesiones que actualmente se consideran precursoras del cáncer de próstata son dos, la hiperplasia adenomatosa atípica (AAH) y la neoplasia intraepitelial prostática (PIN).

La AAH es la lesión menos frecuente, se origina en la zona de transición y su margen de diagnóstico oscila entre un 1% en las biopsias prostáticas (Gaudin y Epstein, 1995) y un 23% en las prostatectomías radicales (Bostwick y Qian, 1995a). Sus características histológicas y citológicas, que son intermedias entre la hiperplasia benigna de próstata y el carcinoma bien diferenciado, sugieren que se trata de una lesión precursora de carcinoma en la zona de transición. La AAH se caracteriza por la formación de nuevas estructuras microglandulares con una capa de células basales incompleta y con distintos grados de atipia nuclear y /o nucleolar. La desaparición de la capa de células basales indica que se trata de un carcinoma (Epstein, 1994; Gaudin y Epstein, 1994). Sin embargo, normalmente el carcinoma localizado en la zona de transición proviene de la invasión de tumores originados en la zona periférica que son más frecuentes y abarcan una mayor extensión que los de esta zona.

Respecto a PIN, la primera sospecha sobre la relación existente entre el cáncer de próstata y el PIN fue cuando en 1954 Franks propuso que la “hiperplasia epitelial” era un precursor del carcinoma prostático. Una década después McNeal describió el término que hoy conocemos como PIN refiriéndose a este como “hiperplasia atípica” (McNeal, 1965). En 1980, Helpap sugirió que la “hiperplasia primaria atípica severa” era una lesión precursora del cáncer. En 1986, McNeal y Bostwick mostraron la existencia de una asociación entre PIN y carcinoma de próstata. Tras estas distintas nomenclaturas que definían el mismo concepto, en 1987 Bostwick y Brawer establecieron el término PIN (*prostatic intraepithelial neoplasia*).

Al igual que en el carcinoma, en la lesión de PIN también se distinguen diferentes grados de malignidad: de bajo grado (PIN 1) y de alto grado (PIN 2 y PIN 3) (Tabla 1). El PIN de alto grado es de peor pronóstico. En algunos casos se ha localizado a una edad temprana de 40 años y su frecuencia incrementa con la edad hasta llegar a encontrarse en un 63 % de individuos de edades comprendidas entre los 61-70 años (Sakr y cols, 1993).

Evidencias a favor de la hipótesis del PIN como lesión precursora del CP.

Existe una fuerte asociación entre PIN y cáncer de próstata (Figura 4), en la mayoría de casos ambos co-existen. La mayoría de los focos de PIN se encuentran en la zona periférica de la próstata en la que se origina el adenocarcinoma invasivo. Más de un 80% de los carcinomas presentan PIN en un radio de 2 mm de distancia respecto al foco tumoral. Normalmente la lesión de PIN se localiza en un 68% de carcinomas de dimensiones medianamente importantes y acostumbra a ser PIN de grado 3. Cuando las dimensiones del tumor abarcan áreas considerables (más de un 75 % de una sección), la probabilidad de encontrar PIN es prácticamente nula.

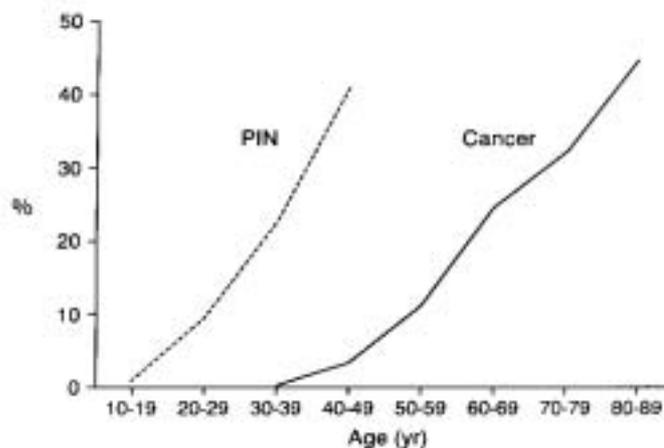


Figura 4. Gráfico de asociación CP y PIN. Datos del PIN (Sakr y cols,1993); datos del CP (Bostwick y cols,1992).

Características	PIN de bajo grado	PIN de alto grado
Arquitectura	Las células epiteliales se presentan estratificadas y agrupadas en espacios irregulares	Similar al PIN de bajo grado pero con agrupaciones y estratificación de mayor magnitud. Existen 4 patrones: "Tufting", micropapilar, cribiforme y plano
Citología Núcleo Cromatina Nucleolo	Alargado, de tamaño variado Normal Raramente prominente	Alargado de tamaño menos variado Aumenta de densidad Alargado y prominente, similar al carcinoma invasivo. Algunas veces múltiple.
Capa de células basales Membrana basal	Intacta Intacta	Puede presentarse discontinua Intacta

Tabla 1. Características de la neoplasia intraepitelial prostática (Bostwick, 1995b).

Las características que conectan la lesión de PIN con el carcinoma invasivo son (Figura 5): la desaparición progresiva de la capa de células basales así como la pérdida de marcadores de diferenciación celular secretora, núcleos y nucleolos anormales, aumento de la proliferación, aumento de la densidad de microvesículas, variación en el contenido del DNA y pérdida alélica (Bostwick y cols,1996a). La pérdida progresiva de la capa de células basales se da en un 56 % de PIN de alto grado, sobre todo si dichas glándulas se localizan adyacentes al carcinoma invasivo (Bostwick y Brawer, 1987). Pese a la pérdida de la capa de células basales, la membrana basal permanece intacta, ya sea en PIN como en adenocarcinomas bien diferenciados. Este hecho es indicativo de que la pérdida de la membrana basal no es un requisito indispensable en el desarrollo temprano del tumor.

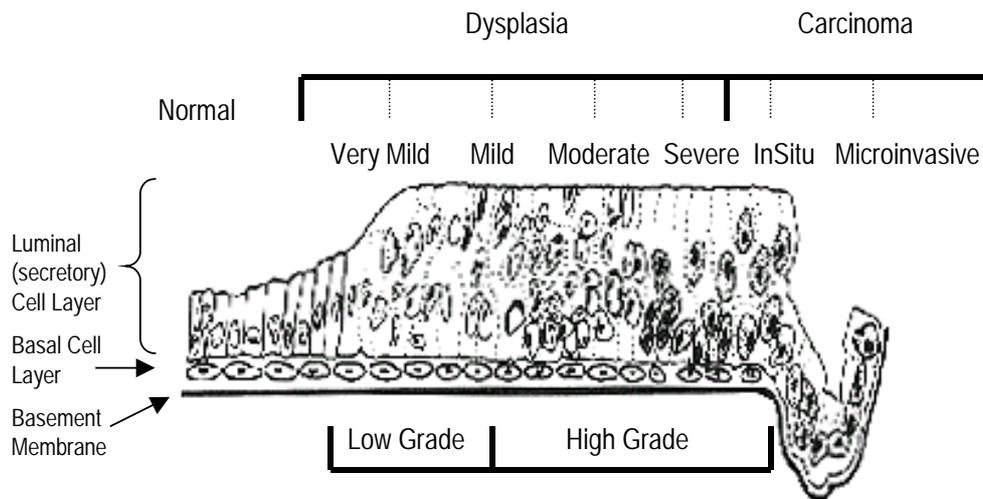


Figura 5. Esquema de la progresión de PIN a CP. La característica más relevante que finalmente diferencia la lesión de PIN del CP es la pérdida de la membrana basal.

Una característica común que comparten las lesiones de PIN y CP, respecto al tejido normal es un incremento en los niveles de colagenasa IV. La colagenasa es un enzima proteolítico que digiere las fibras de colágeno del estroma durante el proceso de invasión (Boag y cols,1994).

Otros fenómenos que evidencian la condición precursora del PIN son el nivel de neovascularización y la tasa de proliferación /apoptosis. El número de vasos que rodean las glándulas con PIN de alto grado es intermedio, superior al número encontrado en tejido normal e inferior al observado en adenocarcinoma (Bigler y cols,1993). Respecto a los cambios detectados en el núcleo, tanto en CP como en PIN encontramos núcleos más alargados, de tamaño mayor y con un número variado de nucleolos prominentes (Tabla 1). El fenómeno de descondensación de la cromatina que acompaña tanto a la lesión de PIN como de CP, puede ser detectado también en el tejido aparentemente normal asociado a estas lesiones. Estos cambios en la cromatina también están ocasionalmente presentes en glándulas prostáticas normales (Colanzi y cols,1999).

IV.2 Progresión del cáncer de próstata a estadios invasivos y metastásicos.

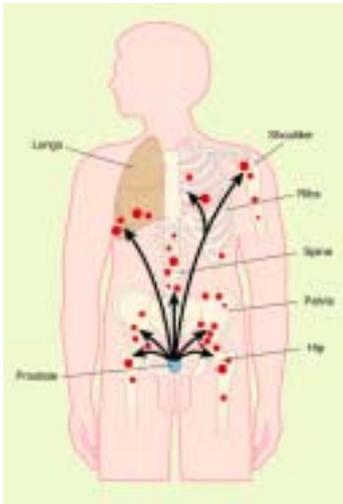


Figura 6.
Imagen de las zonas principalmente afectadas por la metástasis de origen prostático.

El cáncer de próstata normalmente se inicia como una lesión pequeña y bien diferenciada. Algunos carcinomas se mantienen así, mientras que otros aumentan en tamaño y progresan a lesiones moderadamente o escasamente diferenciadas. En estos casos se puede producir el fenómeno de metástasis. En una primera fase estas metástasis invaden nódulos linfáticos y/o hueso (Figura 6). Cuando estas metástasis se localizan en regiones óseas más distantes o en otros órganos como por ejemplo el pulmón, normalmente provienen de otras metástasis y no del tumor primario. Estas también se distinguen por su nivel de diferenciación. El porcentaje de supervivencia de los pacientes con metástasis moderadamente diferenciada es del 79% (5 años) y del 34% (10 años), pero este porcentaje disminuye a 13% (5 años) cuando se trata de una metástasis escasamente diferenciada (Brawn, 1998).

V. ESTADIO CLÍNICO Y GRADO HISTOLÓGICO DEL CP.

V.1 Estadiaje clínico

Actualmente existen dos sistemas de estadiaje clínico: el sistema TNM (*tumor-node-metastases*) ampliamente utilizado en la comunidad europea, y el sistema americano (*Whitmore-Jewitt staging system, modified*). La diferencia entre estos dos sistemas está en que el TNM contiene un mayor número de subdivisiones.

El sistema de estadiaje TNM fue propuesto y publicado en 1978 por el AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) y la UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*). Los tres aspectos que valora este sistema son : el estadio local del tumor, la afectación de los nódulos linfáticos y la presencia de metástasis. A continuación se presenta un esquema del sistema de estadiaje TNM (Figura 7).

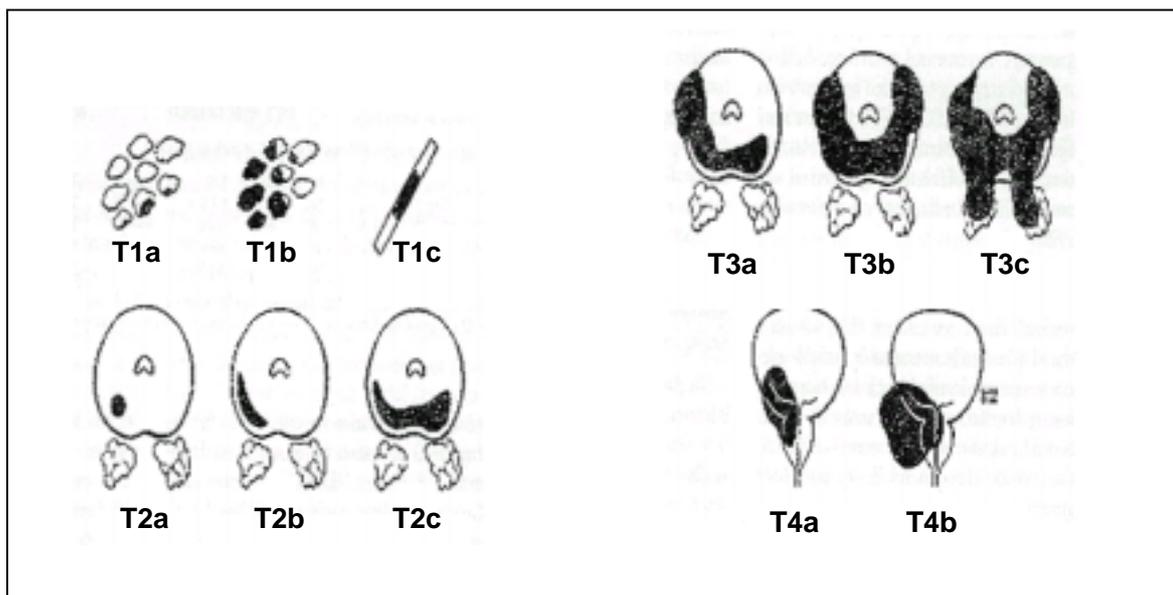


Figura 7. Esquema de los dos diferentes estadios clínicos que definen el cáncer de próstata según el sistema de estadiaje TNM (revisión de 1992). En negro se indica la extensión del CP. (Bostwick y Eble, 1997).

Estadio local:

- T1: carcinoma no detectado clínicamente (tacto rectal normal)

T1A: el carcinoma ocupa < 5% del tejido

T1B: el carcinoma ocupa > 5% del tejido

T1C: el carcinoma se sospecha en biopsia y/o por un aumento del PSA sérico. Carcinoma no palpable.

- T2: intraglandular, palpable en el tacto rectal.

T2a: afecta < 1/2 de uno de los lóbulos

T2b: afecta > 1/2 de uno de los lóbulos

T2c: afecta a los dos lóbulos

- T3: carcinoma localmente avanzado.

T3a: afectación capsular unilateral

T3b: afectación capsular bilateral

T3c: afectación de vesículas seminales.

- T4: afectación de estructuras vecinas

T4a: afectación del cuello vesical, recto o esfínter externo

T4b: afectación del suelo pélvico y elevadores del ano.

Nódulos linfáticos: N0 (no invadidos); N1 (con invasión)

Metástasis: M0 (no existe metástasis); M1 (sí existe metástasis).

V.2 Grado histológico

El sistema Gleason es el método más utilizado para analizar el grado histológico de diferenciación. Fue propuesto por el VACURG (*Veterans Administration Co-operative Urological Research Group*) a partir del análisis de las características histomorfológicas de 4000 muestras entre 1960 y 1975 (Gleason, 1966). En este sistema, la clasificación se basa en el grado de diferenciación glandular y en el patrón de crecimiento tumoral (referido al estroma prostático). Este patrón varía desde bien diferenciado (grado 1) hasta indiferenciado (grado 5) (Figura 8). Debido a que la mayoría de carcinomas prostáticos contiene más de un patrón histológico, este sistema también tiene en cuenta la heterogeneidad en las diferentes áreas del tumor, asignando un grado histológico al patrón predominante o primario y otro a cualquier patrón secundario prevalente. La puntuación combinada de los grados primarios y secundarios está claramente relacionada con la conducta biológica del tumor.

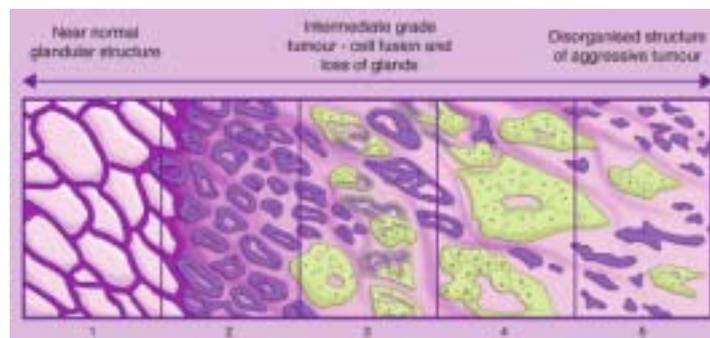


Figura 8. Esquema de los distintos grados de diferenciación que puede presentar el tumor prostático. (Adaptado de Gleason, 1966).

La Tabla 2 detalla las características histológicas establecidas para cada gradación:

Pattern	Peripheral Borders of Tumor	Stromal Invasion	Appearance of Glands	Size of Glands	Architecture of Glands	Cytoplasm
G1	Circumscribed, pushing, expansile	Minimal	Simple, round, monotonously replicated	Medium, regular	Closely packed, rounded masses	Similar to benign epithelium
G2	Less circumscribed, early infiltration	Mild, with delicate separation of glands by stroma	Simple, round, some variability in shape	Medium, less regular	Loosely packed, rounded masses	Similar to benign epithelium
G3A	Infiltration	Marked	Angular, with variation in shape	Medium to large	Variable packed, irregular masses	More basophilic than patterns 1 and 2
G3B	Infiltration	Marked	Angular, with variation in shape	Small	Variable packed, irregular masses	More basophilic than patterns 1 and 2
G3C	Smooth, rounded	Marked	Papillary and cribriform	Irregular	Round to elongate masses	More basophilic than patterns 1 and 2
G4A	Ragged infiltration	Marked	Microacinar, papillary, and cribriform	Irregular	Fused, with chains and cords	Dark
G4B	Ragged infiltration	Marked	Microacinar, papillary, and cribriform	Irregular	Fused, with chains and cords	Clear (hypernephroid)
G5A	Smooth, rounded	Marked	Cornified cribriform	Irregular	Round to elongate masses	Variable
G5B	Ragged infiltration	Marked	Difficult to identify gland lumina	Sheets of glands	Fused sheets and masses	Variable

From Bostwick, DC: Grading prostate cancer. *Am J Clin Pathol* 102(Suppl 1):S78, 1994.

Tabla 2. Características morfológicas asociadas a los diferentes grados de diferenciación del cáncer de próstata. (Bostwick, 1994)

VI. DIAGNÓSTICO PRECOZ DEL CÁNCER DE PRÓSTATA.

Actualmente, las pruebas incorporadas en el diagnóstico precoz del carcinoma de próstata son dos: el tacto rectal (Resnick, 1987) y la determinación sérica del antígeno específico prostático, PSA (Oesterling, 1991a, b). La ecografía transrectal, que había sido considerada como un método útil en el diagnóstico precoz (Waterhouse y Resnick, 1989) hoy en día tiene su mayor utilidad en la práctica de las biopsias sistemáticas ecodirigidas, siempre que se sospecha la existencia de un CP debido a la alteración del tacto rectal o a la elevación sérica del PSA. Aunque el PSA es más sensible que el tacto rectal, ambas pruebas son complementarias (Catalona y cols,1991).

PSA, características clínicas y moleculares.

El PSA es una glicoproteína de cadena única (33 kDa) que en 1971 fue identificada en el plasma seminal por Hara y col. En 1979 fue aislada y purificada a partir de tejido prostático por Wang y col. e incorporado como prueba diagnóstica a partir de 1984 (Ogawa y cols,1984). El PSA es producido y secretado por el epitelio prostático y es una de las proteínas más abundantes del plasma seminal, donde se ha encontrado en concentraciones de 0.2-5.0 mg/ml (Sensabaugh, 1978). El rango normal en suero es de 0.1-4.0 ng/ml. Además de en la glándula prostática, se ha detectado también producción de PSA en las glándulas periuretrales (Frazier y cols,1992). También se han dado casos de detección de niveles mínimos de PSA en la mujer (Ellis y cols,1997; Yu y Berkel, 1999). El PSA contribuye al proceso de licuefacción del semen a través de la hidrólisis de la proteína semenogelin (Schellhammer y Wright, 1993).

El PSA puede encontrarse de tres formas distintas: PSA libre, unido a Alpha-2-macroglobulina (A2M-PSA) y unido a alpha-anti-quimotripsina (ACT-PSA). ACT y A2M son inhibidores de proteasas sintetizados por el hígado. Puede encontrarse también unido, aunque en menor proporción, a la alpha-1-antitripsina y al inhibidor interalfa tripsina (McCormack y cols,1995). La forma inmunoreactiva predominante en suero es ACT-PSA. La forma libre de PSA, que representa un 5-30 % del PSA inmunoreactivo, es inactiva (Lilja y cols,1991). Tras una prostatectomía radical, la forma libre del PSA es eliminada en dos picos, uno a las 2-3 h y el otro a las 20-25 horas tras la intervención (Partin y cols,1993). Sin embargo, ACT-PSA tiene una vida media en sangre de 2-3 días (Oesterling y cols,1995) y el hígado parece ser el lugar de su metabolismo (Agha y cols,1996).

Debido a que el PSA es un marcador específico tisular y no tumoral, se ha observado un solapamiento de los niveles séricos correspondientes a pacientes con hiperplasia benigna de próstata (HBP) y cáncer órgano-confinado. Entre un 38% y un 48% de los pacientes con cáncer órgano-confinado tienen niveles séricos de PSA dentro del rango de lo normal (Sershon y cols,1994). Se han encontrado niveles elevados de PSA en otras patologías prostáticas como son prostatitis, hipertrofia benigna e infarto prostático (Papsidero y cols,1980). También se ha observado un aumento en los niveles de PSA séricos debido a manipulación quirúrgica (Yuan y cols,1992). Esta limitación (Potosky

y cols,1995) vuelve a replantear la necesidad de profundizar en el estudio molecular de la patología prostática con el fin de perfilar y/o complementar con nuevos marcadores los métodos de diagnóstico hasta ahora utilizados.

VII. CARCINOMA ENDOCRINO.

Tanto el crecimiento normal de la próstata como el desarrollo del CP son dependientes de los andrógenos. Esta dependencia androgénica es el fundamento del tratamiento de supresión androgénica llevado a cabo en pacientes con CP. Desde el descubrimiento de la dependencia hormonal androgénica del epitelio y estroma prostáticos, por Huggins y Hodges en 1941, el tratamiento mediante supresión androgénica ha sido considerado como el tratamiento tipo de esta neoplasia. Normalmente se observa una respuesta inicial al tratamiento por supresión hormonal en un 70-80% de pacientes con carcinoma de próstata avanzado. Transcurridos una media de 15 años estos CP progresan hacia un estado independiente de andrógenos. Estos tumores, definidos como hormono-resistentes, difícilmente responden a otras terapias. Por este motivo, la hormonoterapia no es más que un tratamiento paliativo del cáncer, puesto que en definitiva, tras esta maniobra terapéutica, se desarrollan finalmente clones hormono-independientes que provocarán la progresión de la enfermedad. Los carcinomas andrógeno-independientes son clínicamente agresivos y de peor pronóstico, con una media de supervivencia de 9 meses (Stearns y cols,1992). Se asocian a un aumento de la actividad proliferativa y una disminución de la muerte celular por apoptosis (Koivisto y cols,1997; Kaibuchi y cols,2000). El tratamiento de supresión androgénica provoca un aumento de la expresión de Bcl-2 en las células tumorales y este fenómeno se ha asociado con el desarrollo de la independencia androgénica y la quimiorresistencia (Gleave y cols,1999). También la frecuencia de mutación en p53 es superior (94 %) en los casos de tumores hormonorresistentes respecto a la observada en carcinomas localizados (4-60 %) (Moul, 1999).

Actualmente, el tratamiento curativo del CP es sólo posible a través de terapias radicales como la prostatectomía radical o la radioterapia. No obstante, la experiencia clínica acumulada en los últimos 25 años ha demostrado que tan sólo son curativos los carcinomas órgano-confinados (estadios T1 y T2). En los últimos 5 años, y debido a la posibilidad de diagnosticar precozmente el CP, se ha incrementado notablemente el diagnóstico de CP en estadios clínicamente localizados y por este motivo, únicamente alrededor de un 5% de los pacientes diagnosticados de CP padecen la enfermedad en un estadio diseminado, presentando ya en el momento del diagnóstico metástasis ósea y/o linfáticas. En estos casos, las medidas terapéuticas actualmente disponibles son sólo paliativas. La identificación de marcadores específicos del CP que permitan su detección en fases tempranas de su progresión maligna y hacia la hormonorresistencia, podrían ser muy útiles para la toma de decisiones terapéuticas que mejoren el pronóstico y evolución de la enfermedad.

Los mecanismos moleculares implicados en la progresión del carcinoma hacia un estadio independiente de andrógenos se desconocen. Por ahora la atención se ha centrado en el receptor de andrógenos (AR) y sus vías de señalización.

Receptor de andrógenos. Características moleculares

El AR es miembro de la familia de receptores esteroideo/tiroideos/ácido retinoico que se unen a elementos de respuesta específicos en genes diana regulando así la transcripción. En la próstata en desarrollo, sólo las células estromales expresan receptor de andrógenos sugiriendo que la regulación androgénica sería mediada vía las células estromales. En la próstata normal de un individuo adulto, el AR se encuentra principalmente en el epitelio de las glándulas prostáticas aunque también se puede encontrar en el estroma. Sin embargo, en muestras de cáncer de próstata la presencia del AR en las células epiteliales es heterogénea y tiende a disminuir notablemente sobretodo en tumores mal diferenciados.

El AR es un factor de transcripción activado por ligando. La proteína es de 105 kDa y está compuesta, como la mayoría de receptores esteroideos, de un dominio C-terminal de unión a hormona, un dominio de unión al DNA y un dominio de transactivación. Está localizado como monómero en el citoplasma de las células positivas, formando un complejo con proteínas heat-shock (HSPs) que lo mantienen inactivo. Al unirse los andrógenos, el AR cambia de conformación y se libera de las HSPs. De esta manera puede darse la fosforilación, dimerización y translocación hacia el núcleo, donde el complejo se une a los elementos de respuesta a andrógenos (ARE) de los genes diana (Figura 9). El gen del AR (>90 kb), está localizado en el cromosoma Xq11-12. En tejido prostático ha sido demostrada la existencia de dos mensajeros, resultado de un "splicing" alternativo en la región no traducida UTR-3' (Faber y cols,1993). La secuencia de cDNA del receptor de andrógenos presenta un marco de lectura de 2730 pares de bases que codifica para una proteína de 98.5 kDa.

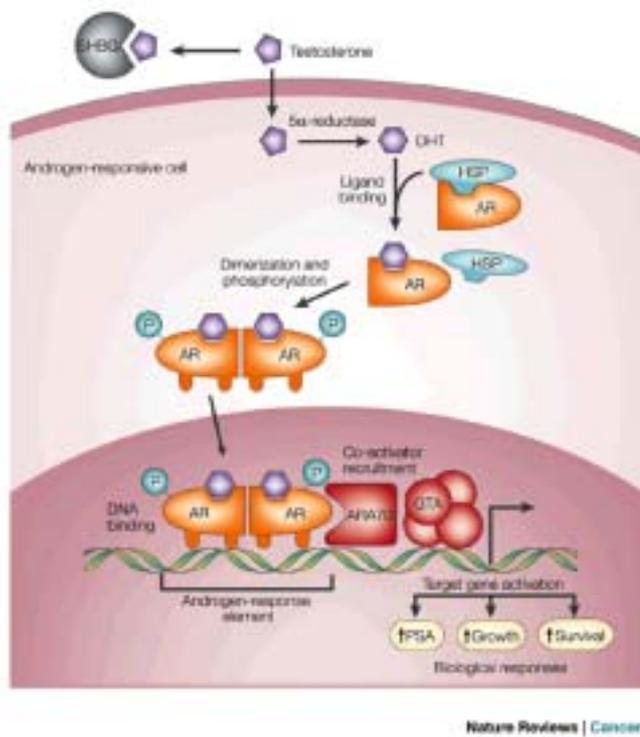


Figura 9. Acción de los andrógenos. La testosterona libre (no unida a albúmina ni a SHBG) entra en la célula prostática y es convertida a dihidrotestosterona por el enzima 5- α -reductasa. Su unión al AR hace que este se libere de las HSPs. Entonces los AR libres dimerizan entre si y ya pueden unirse a los elementos de respuesta a andrógenos (Feldman and Feldman,2001).

El mecanismo de progresión hacia la independencia androgénica puede ser consecuencia de varios fenómenos como una importante disminución en los niveles de expresión del receptor (Tilley y cols,1990) una amplificación del receptor (Visakorpi y cols,1995a) o mutaciones en la región de unión a ligando (Klocker y cols,1994) que hacen que el AR responda a niveles inferiores de andrógenos, a otros esteroides o a antiandrógenos. Por otro lado, el AR también puede ser activado por factores de crecimiento peptídicos o citoquinas que desencadenen otras vías de señalización (AKT y/o MAPK) que se traduzcan en un aumento de la proliferación y crecimiento del tumor (Feldman, 2001). En este campo, cabe destacar un último trabajo publicado recientemente en el que demuestran que los factores neurotróficos bombesina y neurotensina, juegan un papel importante en la activación del AR en ausencia de andrógenos, a través de proteínas G que se traduce en la activación de las vías de las tirosin quinasas Etk/BMX, FAK y Src (Lee y cols,2001).

Existen numerosos trabajos sobre las mutaciones encontradas en la región codificante de unión al ligando del AR; sin embargo, la frecuencia de estas mutaciones no es clara (Tilley y cols,1996). Se han observado mutaciones en un 44% de los tumores primarios analizados. Este dato sería consistente con la hipótesis siguiente: la progresión rápida del CP hacia el estado de andrógeno independencia podría ser debido a mutaciones ya existentes antes del tratamiento de supresión androgénica, más que a nuevas mutaciones manifestadas posteriormente (Gaddipati y cols,1994). Estas mutaciones en el dominio de unión al ligando, se han observado tanto en CP andrógeno-independientes como en carcinomas metastásicos. El aumento en el número de copias génicas también ha sido relacionado con la resistencia al tratamiento por supresión androgénica (Visakorpi y cols,1995a). Dicho aumento estaría directamente relacionado con una sobreexpresión del receptor, la cual facilitaría el crecimiento de las células tumorales en presencia de niveles bajos de andrógenos.

Recientemente han sido clonados un importante número de coreguladores del AR que incluyen tanto represores como activadores (Yeh y Chang, 1998; Moilanen y cols,1998a, b; Kotaja y cols,2000; Kang y cols,1999; Fujimoto y cols,1999; Yeh y Chang, 1996; Hsiao y Chang, 1999). Una interacción indebida entre estas moléculas coactivadoras y el AR podría modificar la actividad transcripcional del AR y por tanto jugar un papel importante en la progresión del cáncer de próstata. Un ejemplo sería la interacción de la proteína asociada al receptor de andrógenos 70 (*androgen receptor associated protein 70*, ARA70) con el AR en respuesta a antiandrógenos como la bicalutamida o la flutamida que se traduce en una activación del AR en ausencia de andrógenos (Miyamoto y cols,1998).

Estudios *in vitro*, han demostrado que la vía de señalización del receptor de andrógenos puede ser activada también por otros factores de crecimiento, como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Culig y cols,1994). Estudios

recientes han relacionado directamente la expresión del oncogen HER-2/neu (ERBB2) con la adquisición del fenotipo andrógeno independiente y con un incremento de los niveles de expresión del antígeno específico de próstata (PSA) (Craft y cols,1999). Esta inducción de la expresión de PSA podría ser mediada por la vía de señalización de la MAP quinasa. HER-2/neu promovería la interacción entre AR y sus cofactores como ARA70. De esta manera, podría ser que HER-2/neu y MAP quinasa estuvieran implicadas en el carcinoma de próstata recurrente en presencia de niveles bajos de andrógenos mediante la transactivación del AR (Yeh y cols,1999).

VIII. ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA PROGRESIÓN TUMORAL. GENES Y MARCADORES TUMORALES DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

VIII.1 Aberraciones cromosómicas en cáncer de próstata. Detección y significado biológico.

La hipótesis sobre la que se fundamentan los estudios citogenéticos, desde la citogenética clásica hasta los nuevos avances en la hibridación genómica comparada, es que el cáncer es el resultado de un acúmulo de cambios genéticos que afectan a la expresión de genes críticos. Los carcinomas, incluyendo el de próstata, se desarrollan a partir de un proceso de múltiples etapas que están asociadas a una serie de cambios genéticos que se traducen primero en un aumento de proliferación, seguido de una transformación maligna y finalizando en el fenómeno metastásico (Kinzler y Vogelstein, 1996). El número y tipo de genes implicados en este proceso puede variar entre distintos tumores. La mayoría de estos cambios ocurren en células somáticas. Sólo una pequeña proporción (9%) de los tumores prostáticos derivan de cambios genéticos en células germinales que se traducirían en una predisposición hereditaria a desarrollar carcinoma. Parece ser que en 1/3 de este porcentaje familiar estaría implicada la región cromosómica HPC1 (1q24-25). Otras regiones igualmente implicadas son PCAP (1q42-43), CAPB (1p36) y HPCX (Xq27-28).

La utilización de las técnicas de citogenética clásica, análisis de la pérdida de heterozigosidad (LOH), hibridación in situ con fluorescencia (FISH), hibridación genómica comparada (CGH) y recientemente la técnica de *microarrays* genómicos, converge en un sólo objetivo que es la identificación de genes o regiones cromosómicas alteradas ya sea por deleciones, amplificaciones, translocaciones y que por tanto pueden considerarse potencialmente implicadas en esta patología tumoral. Debido a que cada técnica tiene sus ventajas y desventajas, es necesario complementar la información con varias de ellas, con el fin de resolver las posibles discrepancias que pudieran existir. Por otro lado, es importante tener presente aquellos sucesos genéticos implicados en la carcinogénesis que no pueden ser

detectados a nivel citogenético como es el caso de las mutaciones puntuales o los cambios a nivel epigenético. Por este motivo, las técnicas citogenéticas y moleculares han de complementarse entre si para poder detectar el máximo número de alteraciones.

Las alteraciones cromosómicas más comunes en PIN y CP son pérdidas de 1p, 6q, 8p, 10q, 13q, 16q y 18q y ganancias de 1q, 2p, 7, 8q, 18q y Xq. En estas regiones se han identificado genes supresores de crecimiento tumoral y oncogenes (Nupponen y cols,2000a, b). Los valores presentados en la figura 10 provienen de un estudio realizado por Cher y col en 1996 en el que mediante la técnica CGH analizaron las alteraciones cromosómicas en dos tipos de poblaciones de prostatectomías radicales. Pese a no encontrarse representado en este gráfico, también existen otros cromosomas que se han asociado a esta etapa del desarrollo tumoral como son una amplificación del cromosoma Xq y 18q.

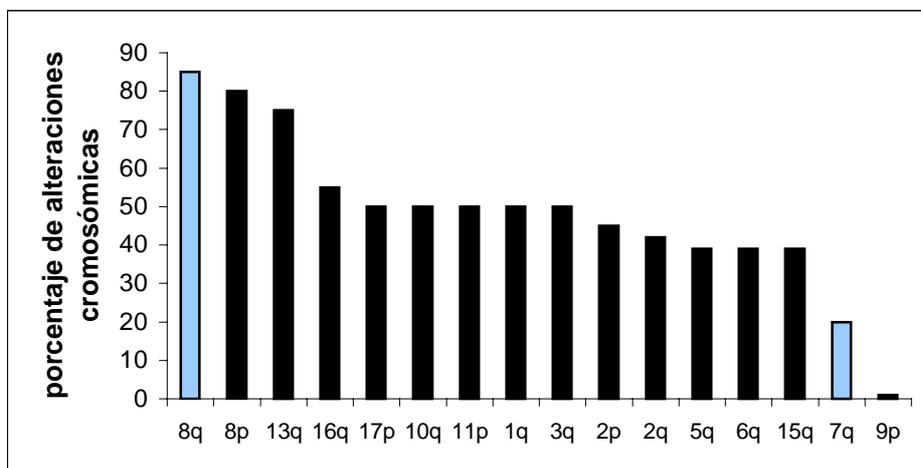


Figura 10. Representación del porcentaje de alteraciones cromosómicas encontradas en carcinomas metastásicos de próstata. Se han señalado en negro las pérdidas cromosómicas y en azul las ampliaciones.

En este estudio, la primera población correspondía a muestras prostáticas de pacientes con metástasis que no habían sido sometidos previamente a terapia anti-androgénica. La segunda población correspondía a muestras metastásicas independientes de andrógenos, recurrentes tras el tratamiento de supresión androgénica. Tras observar prácticamente el mismo porcentaje de alteraciones cromosómicas en ambas poblaciones, sugieren que los tumores metastásicos no tratados contienen todas las alteraciones cromosómicas necesarias para originar un carcinoma recurrente durante el proceso de terapia anti-androgénica. Es decir, las mutaciones se originarían previamente y no como resultado de la presión genética ejercida por la terapia anti-androgénica. Estos datos contrastan claramente con los presentados por otros autores que detectan, por

ejemplo, una mayor frecuencia de mutaciones en el AR de pacientes con tumores hormono-resistentes.

Lo que está claro es que la progresión del cáncer de próstata es un proceso de múltiples etapas en las que se van sucediendo y acumulando una serie de alteraciones. A lo largo de este tiempo se ha intentado establecer algún patrón de alteraciones génicas que definan esta progresión (Avery, 1998) (Figura 11). Sin embargo, ninguno de los patrones descritos es definitivo ya que continuamente se está ampliando la información en este campo y porque, debido a la heterogeneidad histológica que presenta este tipo de tumor, no existe ningún patrón común que defina el curso de las distintas etapas del cáncer de próstata.

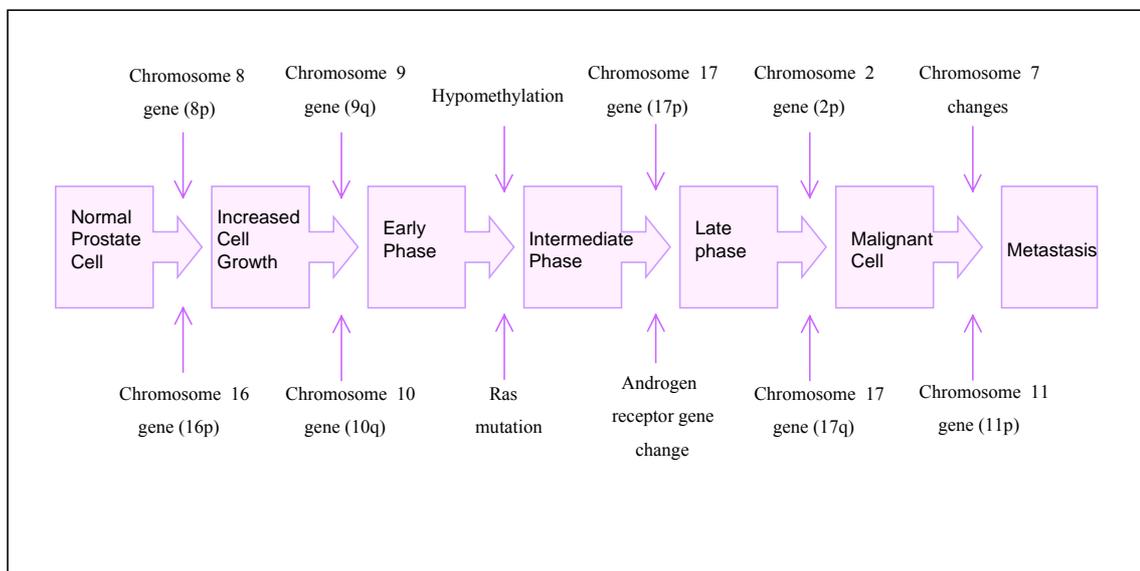


Figura 11. Patrón de alteraciones genéticas en cáncer de próstata propuesto por Avery A en 1998.

A continuación se presenta una descripción detallada de las alteraciones más comunes asociadas a la patología tumoral del cáncer de próstata.

Cromosoma 8: El análisis de la pérdida en muestras tumorales de las regiones 8p12 (80%) y 8p21-23 (45%) mediante las técnicas anteriormente mencionadas y la reproducibilidad de los resultados obtenidos, hace pensar que es una región que contiene genes supresores del CP (Kagan y cols,1995). En la región 8p21.1 ha sido localizado el gen *CAKb* (quinasa implicada en la adhesión celular). La pérdida de la región 8p12 también ha sido hallada en PIN (63%) lo que hace suponer que sería un suceso temprano en la formación del tumor (Matsuyama y cols,1995). Por otro lado, la pérdida de 8p21.3-22 ha sido observada con una mayor frecuencia en casos

letales de CP, sugiriendo que lesiones en esta región estarían asociadas a la progresión tumoral (Suzuki y cols,1995).

La amplificación del brazo largo 8q, se ha encontrado en un 89% de tumores recurrentes y en un 6% de tumores primarios (Visakorpi y cols,1995b) y sería un suceso tardío en la progresión tumoral. El gen *c-Myc*, localizado en la región 8q24, está amplificado (Jenkins y cols,1997) y este evento ha sido asociado a metástasis en nódulos linfáticos (Van den Berg y cols,1995). Recientemente se ha encontrado una amplificación de la región 8q23 que afecta al gen *EIF3S3* que codifica para la subunidad p40 del factor de inicio de traducción eIF3 (Nupponen y cols,2000a).

Cromosoma 13: Existen dos regiones delecionadas mayoritariamente en cáncer de próstata, la región 13q21.1-31 y la región 13q33, cuyas frecuencias de deleción en cáncer de próstata son del 9% y del 50%, respectivamente. Ambas se han asociado a estadios avanzados del desarrollo tumoral (Visakorpi y cols,1995a; Dong y cols,2000; Hyytinen y cols,1999). El gen del retinoblastoma (*RBI*) se localiza en la región 13q14. La pérdida de esta región se ha asociado a etapas precoces del desarrollo tumoral prostático. Se ha postulado también que en el extremo telomérico de *RBI* podría existir otro gen supresor tumoral cuya deleción estaría asociada con etapas más avanzadas del cáncer de próstata. Yin y cols,1999; Brooks y cols,1995; Phillips y cols,1994).

Cromosoma16: Un estudio realizado por Cher y col. en 1996 afirma que en un 50% de los carcinomas de próstata localizados existe pérdida de la región 16q24 y 16q23.1-23.2. Otros trabajos describen esta pérdida en un porcentaje mayor de tumores metastásicos y recurrentes (Visakorpi y cols,1995a; Suzuki y cols,1996). Es importante resaltar que el gen para la E-cadherina, localizado en la región 16q22.1, no muestra ninguna mutación en CP (Suzuki y cols,1996).

Cromosoma 10: La región más afectada es 10q24. La pérdida de esta región se ha relacionado más con etapas avanzadas del tumor y metástasis así como en carcinomas recurrentes tras tratamiento por supresión de andrógenos. Un gen supresor candidato en esta región es *MXII*, *Max-interacting protein-1* (10q24-25) que es un regulador negativo del oncogen *Myc*. Otro gen localizado en esta región, cuya pérdida de función en cáncer de próstata ya ha sido demostrada, es *PTEN* o *MMAC1* (10q23). El gen *PTEN* fue clonado posicionalmente basándose en la pérdida de heterozigosidad en cáncer de mama, cerebro y próstata. Se han encontrado deleciones o mutaciones puntuales de este gen en glioblastomas multiformes, carcinoma de endometrio, carcinoma de ovario endometriode y cáncer de próstata. Concretamente, la pérdida de función sucede en un 10-20% de los tumores órgano-confinados y en más de un 50% de carcinomas de próstata avanzados. La transfección del gen *PTEN* in vitro disminuye la proliferación celular y la capacidad tumoral de glioblastomas con mutación en *PTEN* (Rubin y cols,2000; Suzuki y cols,1998; Cairns y cols,1997).

Cromosoma 17: Se ha detectado pérdida del brazo corto en un 65% de las metástasis andrógeno independientes (Cher y cols,1996) por lo tanto, es una región implicado en estadios avanzados del CP. Existen dos genes de interés localizados en esta región, *TP53* (17p13.1) y *ELAC2* (17p11). Este último corresponde al primer gen de susceptibilidad al cáncer (HPC2) de próstata identificado mediante clonación posicional. En *ELAC2* se han encontrado dos mutaciones puntuales que corresponden a cambios de aminoácidos que se asocian con el fenotipo tumoral de cáncer de próstata, un cambio de serina a leucina en la posición 217 (S217L) y otro de alanina a treonina en la posición 541 (A541T). Se ha observado que el riesgo de padecer cáncer de próstata aumenta un 2.9% en los casos S217L y un 31.6% en los casos A541T (Rebbeck y cols,2000). En cuanto al gen *TP53*, las mutaciones más frecuentes son un cambio de los nucleótidos G:C por A:T que dan lugar a mutaciones sin sentido en los *hot spot* CpG de dicho gen. También se ha postulado que las células con el gen *TP53* mutado son seleccionadas clonalmente durante el proceso de metástasis prostática (Navone y cols,1999).

En el brazo largo del cromosoma 17, concretamente en la región 17q21, se localiza el gen *BRCA1*. Existe cierta controversia en los estudios realizados en 17q ya que, si bien se ha observado que el gen *BRCA1*, responsable de la predisposición hereditaria al cáncer de mama, se pierde en algunos casos de CP junto a la pérdida también de otra región distinta del mismo brazo, se han observado también ganancias de material genético en 17q (Cher y col,1996).

Cromosoma 18: la amplificación de 18q se ha observado en carcinomas de próstata recurrentes. En este cromosoma se localiza *bcl-2* (18q21.3). Paralelamente, en muchos tipos de carcinomas, entre ellos el prostático, también se ha observado pérdida alélica de la región 18q21 donde se localizan los genes que codifican para las proteínas *Smad2* y *Smad4* (*DPC4*) (Ueda y cols,1997).

Cromosoma 7: Mediante las técnicas de FISH y CGH se han observado tanto una trisomía del cromosoma 7 como una amplificación del brazo largo 7q. Pese a que existen autores que lo consideran una mutación genética neutra por encontrarse también alterado en algunas muestras de tejido benigno, los estudios realizados por Alcaraz y col. y otros investigadores sugieren la amplificación de 7q (Alcaraz y col 1994) y la trisomía del cromosoma 7 (Bandyk y cols,1994) como factores pronóstico implicados en la progresión y metástasis del carcinoma de próstata. El cromosoma 7 contiene genes conocidos, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*), la quinasa *CLK2*, el gen para la glicoproteína P *MDR1* y el factor de elongación 1- γ . La alteración de la función de estos genes está implicada en la progresión del cáncer de próstata. Recientemente se ha observado que el aumento de expresión de caveolina, localizada en la región 7q31 está implicado en la lesión metastásica del cáncer de próstata y con la insensibilidad a andrógenos (Yang y cols,1998).

Cromosoma 6: Se ha observado pérdida de 6q en un 35% de tumores de próstata metastásicos. Existen varios genes candidatos en el cromosoma 6q que podrían estar implicados en la carcinogénesis prostática, como son el IGF-IIIR (*insulin-like growth factor II receptor*, 6q26), la proteína reguladora del ciclo celular ciclina C (6q21) y el gen *tpc* el cual codifica para una proteína similar a la proteína ribosomal S10. (Cher y cols,1996)

Cromosoma X: En un 30% de carcinomas recurrentes se ha observado una amplificación en la región Xq11-Xq13. Esta región incluye al gen para el receptor de andrógenos AR. Se han hallado amplificaciones de dicho gen en pacientes que en el transcurso del tratamiento por supresión androgénica se han hecho resistentes (Visakorpi y cols,1995a). Por otro lado, la región Xq27-q28 ha sido propuesta como un locus susceptible al cáncer de próstata (HPCX) (Peters y cols,2001).

VIII.2 Alteraciones moleculares. Búsqueda de nuevos genes implicados en el desarrollo tumoral.

La acumulación de distintos eventos genéticos y moleculares determinan el fenotipo de un tumor dado (Kinzler y Vogelstein, 1996). Existen rutas bioquímicas cuya alteración parece ser necesaria en el desarrollo de la mayoría de neoplasias ya que regulan procesos celulares básicos en todas las células. Por lo tanto, un compromiso en la integridad de estas rutas puede conducir al crecimiento incontrolado característico de toda neoplasia. La mayoría de neoplasias requieren, al menos, la alteración de tres rutas: control del ciclo celular, control de la muerte celular programada y activación de la ruta de mantenimiento de los telómeros.

En los últimos años, el estudio de las alteraciones moleculares específicas asociadas al desarrollo tumoral se ha centrado en el análisis del patrón de expresión génica del tumor. Además de estudiar la expresión de genes (oncogenes y/o genes supresores de tumores) conocidos, se han desarrollado metodologías para estudiar el patrón de expresión, como la técnica de hibridación sustractiva (Sive y St John, 1988; Duguid y cols,1988; Sagerstrom y cols,1997), la técnica *Representational difference analysis* (RDA) basada en la combinación de las técnicas de hibridación sustractiva y PCR (Lisitsyn y cols,1993), la hibridación diferencial o *differential display* (Wan y cols,1996) o los recientes “arrays” de DNA. El método de *differential display*, descrito por Liang y Pardee en 1992, permite la comparación simultánea de RNA mensajeros de múltiples muestras, pudiéndose analizar al mismo tiempo genes cuya expresión está aumentada o que se encuentran regulados negativamente. En cáncer de próstata esta técnica ha sido ampliamente utilizada en el estudio de cambios de expresión génica durante el desarrollo tumoral de manera general o más específicamente en la búsqueda de genes implicados en la transición del estado hormono-dependiente al independiente (gen PSCA, *Prostate Stem Cell Antigen*) (Reiter y cols,1998) o también en la búsqueda de genes implicados en invasión y metástasis (Bangma y cols,1999). Estos estudios se han realizado partiendo de extracciones de RNAm de tejido prostático, líneas celulares y sistemas de modelos de xenoinjertos en ratones. Son muchos los genes que han sido hallados por esta vía, aunque su

utilidad como marcadores tumorales así como herramientas en terapia génica está todavía por determinar.

Recientemente, gracias a los avances en los campos de la genómica y la biotecnología se ha podido obtener una mayor información sobre los aspectos moleculares de la patología prostática. Uno de estos avances ha sido la generación de bases de datos de los genes y ESTs, hasta ahora conocidos, a modo de archivos que permiten distinguir entre los genes mayoritariamente expresados en cáncer y en tejido normal. Un segundo avance ha sido la construcción de *microarrays* que contienen miles de genes distintos expresados en tejido prostático. De esta manera puede analizarse simultáneamente la expresión de todos ellos en diversos estados de la próstata. En un futuro se contempla la posibilidad de crear “microchips” que permitan diagnosticar el cáncer de próstata y la agresividad de este en pacientes con CP o con riesgo a padecer esta patología (Luo y cols,2001; Paweletz y cols,2001; Grouse y cols,2001; Williams y Brooks, 2001; Nelson y cols,2000; Howell, 1999; Mucci y cols,2000; Elek y cols,2000; Lin y cols,2000; Bubendorf y cols,1999a, b ; Cole y cols,1999).

Entre los genes hallados mediante la utilización de estas técnicas y que se encuentran potencialmente implicados en la patología prostática encontramos: *NKX3.1*, *prostate-specific homeobox gene* (Ornstein y cols, 2001; Bowen y cols, 2000); *PSCA*, antígeno de superficie celular altamente expresado en cáncer de próstata (Reiter RE, 1998); *DD3*, gen específico de próstata, sobreexpresado en cáncer de próstata, hallado por *differential display* (Bussemakers y cols,1999b); *PSMA*, *Prostate Specific Membrane Antigen* (Israeli y cols,1994); *caveolina 1* (Yang y cols,1998); *AIPC*, *activated in prostate cancer* (Chaib y cols,2001); *UROC28* (An y cols,2000); *DPM3/prostin-1* (Manos y cols,2001); *PRAC* (Liu y cols,2001); *Trp-p8* (Tsavaler y cols,2001); *Prostein* (Xu y cols,2001); *PSDR1*, *Prostate short-chain dehydrogenase reductase 1* (Lin y cols,2001); *CaT-L* (Wissenbach y cols,2001); *PCTA-1*, *prostate carcinoma tumor antigen-1* (Gopalkrishnan y cols,2000); *ERGIC-53* (Yerushalmi y cols,2001) y el gen hallado en nuestro laboratorio mediante la técnica de *differential display*, *PTOVI* (*Prostate Tumor Over expressed 1*) (Benedict y cols,2001) y que recientemente se ha encontrado también en estudios con *microarrays* (Luo y cols,2001). Es de esperar que, a partir de toda esta información, pueda establecerse un patrón de progresión tumoral asociado a las distintas alteraciones génicas observadas desde la lesión precursora o carcinoma in situ (PIN) hasta el carcinoma recurrente metastásico independiente de andrógenos y de esta manera, poder utilizar esta información en el tratamiento adecuado de esta enfermedad.

En 1996, Boswick (Bostwick y cols,1996a) propuso un patrón que, pese a no ser el definitivo (Figura 12) ni ser representativo debido a la gran heterogeneidad del cáncer de próstata, es de gran utilidad a la hora de entender que el cáncer de próstata es una enfermedad

que requiere de un gran número de alteraciones genéticas y moleculares para originarse y progresar a través de las distintas etapas que lo definen.

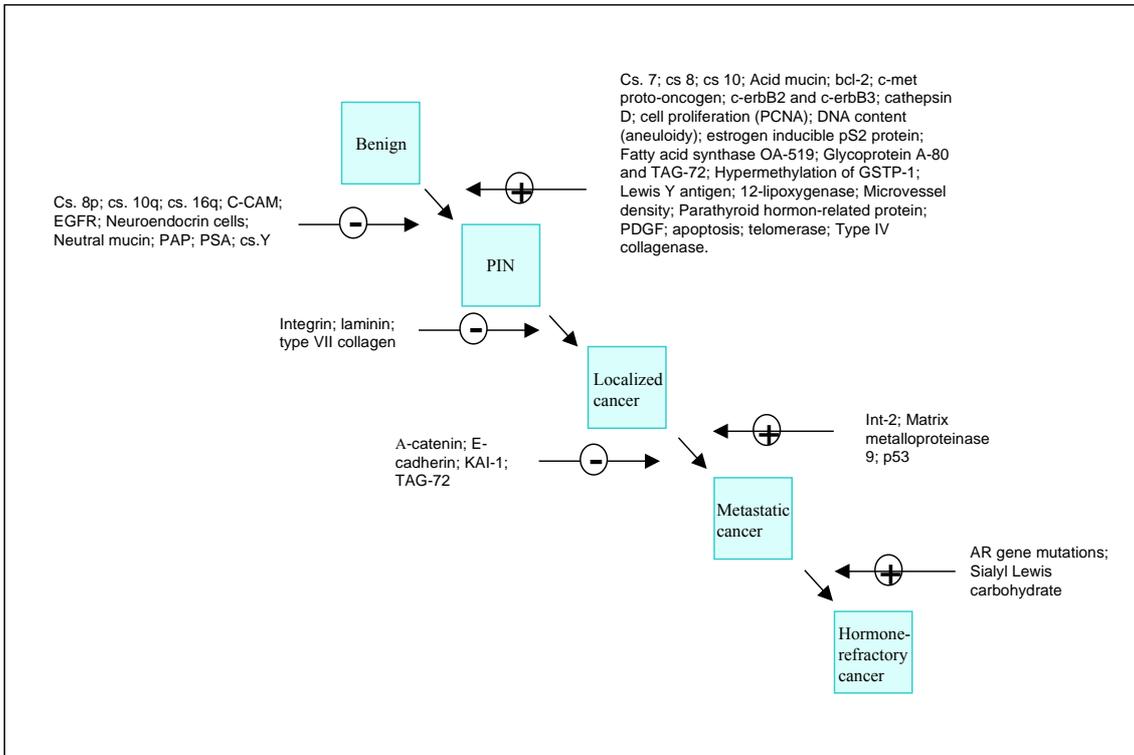


Figura 12. Patrón de progresión tumoral propuesto por Bostwick en 1996.

Entre los genes más ampliamente estudiados en el campo de la patología tumoral prostática encontramos:

- Regulación del ciclo celular

El gen **RBI** (13q14): codifica para una proteína de 110 Kda que participa en la regulación del ciclo celular (Figura 13). Durante la fase G0 del ciclo, la proteína RB hipofosforilada se une al factor de transcripción E2F-1 y lo inactiva de manera que este no puede inducir la expresión de los genes necesarios para la síntesis de DNA durante la fase S. En presencia de factores de crecimiento, las células entran en fase G1 y progresan a S. Para ello, es fundamental la fosforilación de RB. Esta fosforilación es llevada a cabo por un complejo de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) que son enzimas de fosforilación que asociadas a las proteínas ciclina, forman un complejo CDK-ciclina responsable del correcto funcionamiento del ciclo celular. En este caso, el complejo CDK4/ciclina D sería el responsable de promover la progresión del ciclo celular mediante la fosforilación de la proteína RB. Cuando esto sucede, RB se inactiva y el ciclo continúa a través de la fase S. El complejo CDK4/ciclina D está regulada negativamente por p16^{Ink4a}, una proteína inhibidora de ciclinas. p16 previene la activación del complejo CDK4/ciclina D mediante su unión y secuestro del componente CDK4. Como resultado de esta acción, la proteína RB no es fosforilada y el ciclo celular se para (Steiner y cols,2000).

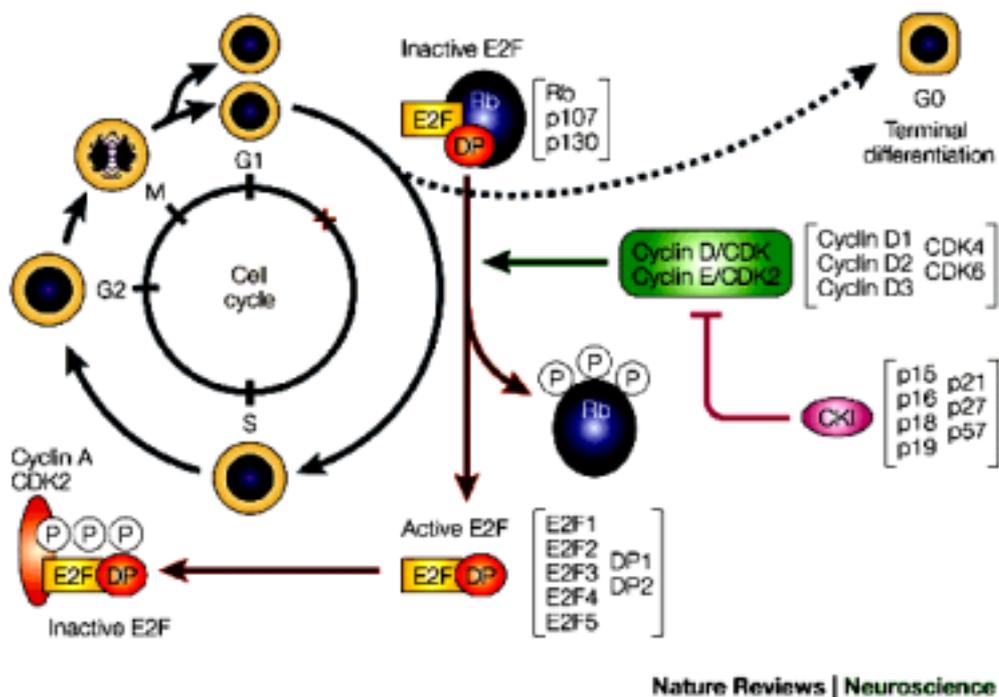


Figura 13. Esquema de la progresión del ciclo celular y del papel que juega la proteína RB en este. (Dyer y Cepko, 2001)

El gen **CDKN2A** codifica para la proteína p16^{Ink4a} que, a demás de ser un inhibidor específico de la quinasas dependientes de ciclinas CDK4, también lo es de CDK6. p16 se localiza en la región cromosómica 9p21, frecuentemente deletionada (43%) en tumores primarios de cáncer de

próstata (Cairns y cols,1995). Esta disminución es principalmente a nivel transcripcional y podría ser debida al fenómeno de metilación del DNA (Herman y cols,1995). Se ha detectado metilación del promotor en las líneas celulares tumorales de próstata PC3, PPC-1 y TSU-Pr1 (Chi y cols,1997; Jarrard y cols,1997). Por otro lado, también se ha observado sobreexpresión de *p16* en cáncer de próstata asociado a etapas avanzadas del desarrollo tumoral (Lee y cols,1999; Halvorsen y cols,2000). La frecuencia de mutación del gen *p16* es superior a la del gen *RB*. Aunque las mutaciones en ambos genes parecen estar implicados en la misma vía celular, queda por explicar por qué las mutaciones en *RB* se asocian más a tumores como son retinoblastoma, osteosarcoma, cáncer de pulmón y las mutaciones en *p16* se asocian más a tumores como melanomas y cáncer de pancreas (Kamb y cols,1994).

La proteína **p27^{Kip1}** previene la entrada en fase S del ciclo celular cuando el DNA ha sido dañado. Pese a que no existe pérdida génica en ningún tipo de tumor (Bullrich y cols,1995), su pérdida de expresión se ha considerado como factor de peor pronóstico en cáncer de próstata (Cote y cols,1998).

- Genes supresores de tumor

PTEN (10q23): es un gen supresor tumoral que se encuentra mutado en un elevado porcentaje de carcinomas de mama, próstata y glioblastoma. En próstata está asociado a estadios avanzados metastásicos. Presenta una elevada homología con la proteína Tensin que media la interacción del citoesqueleto con las placas de adhesión focal a la matriz extracelular. La proteína PTEN, de 55 kDa, tiene una actividad proteína tirosina fosfatasa que es capaz de defosforilar tanto residuos de tirosina como de serina/treonina. La principal función conocida de PTEN es la regulación negativa de la vía de actividad anti-apoptótica de la quinasa AKT mediante su acción sobre los niveles de PIP-3 (fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato) (Figura 14). Los niveles de PIP-3 son muy bajos en las células quiescentes. Tras la estimulación con factores de crecimiento, la proteína PI3-quinasa se activa y en consecuencia, los niveles de PIP-3 aumentan. En respuesta a estos niveles de PIP-3, las proteínas portadoras de un dominio pleckstrina migran a membrana. Una de estas proteínas es el proto-oncogen AKT que es una proteína quinasa (serina/treonina) de actividad antiapoptótica ya que, tras activarse por fosforilación, previene la liberación del citocromo c desde la mitocondria e inactiva los factores de transcripción *Forkhead*, responsables de activar genes implicados en la apoptosis celular. La función de PTEN es mantener los niveles de PIP-3 bajos. Por lo tanto, la pérdida de la función de PTEN se traduce en un aumento de la concentración de PIP-3 y en una hiperactivación de la vía de AKT (Myers y cols,1998; Wu y cols,1998b).

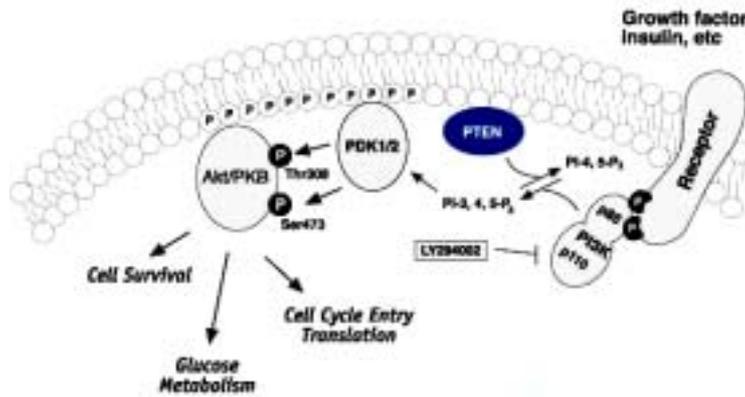


Figura 14. Acción de PTEN sobre el control de la proliferación y la muerte celular. PTEN inhibe la vía de señalización de AKT mediante el manteniendo los niveles de PIP-3 bajos .

La actividad de PTEN se ha asociado también a otras funciones celulares como la regulación del ciclo celular mediante la activación post transcripcional de la proteína p27 que se traduce en una parada del ciclo celular en G1 (Medema y cols,2000). De hecho, se ha observado que, cuando los niveles de PTEN son bajos, el aumento de la actividad de la vía AKT está asociado a una disminución de los niveles celulares de p27 (Graff y cols,2000). Este efecto de PTEN sobre el ciclo celular parece depender también de la inhibición de la vía de AKT ya que los inhibidores de la PI3-K (por ejemplo, LY294002) realizan el mismo efecto sobre el ciclo celular y los niveles de p27. También se ha visto que PTEN puede modular la adhesión y migración celular mediante su acción sobre las proteínas quinasa de adhesión focal (FAK) y la proteína transformante Shc (Di Cristofano y Pandolfi , 2000).

KAI1 (11p11.2): es un supresor tumoral del proceso metastásico del cáncer de próstata que se expresa en una gran variedad de tejidos humanos (Dong y cols,1995). En cáncer de próstata su expresión es bifásica en el sentido de que está aumentada en tumores primarios bien diferenciados y empieza a disminuir a medida que progresa el desarrollo tumoral (Dong y cols,1996; Ueda y cols,1996). Esta disminución también se ha detectado en otros tipos de tumores como pulmón, mama, vejiga y pancreas (Mashimo y cols,1998). Su pérdida alélica es infrecuente y su disminución es principalmente a nivel postranscripcional. Una de las causas podría ser debida a una disminución previa de p53 desde que se ha visto que p53 es un activador de la transcripción de este gen (Mashimo y cols,1998).

- Factores de transcripción

TP53 (17p13): codifica para la proteína p53 que fue identificada como una proteína celular asociada al antígeno T de SV40 y como producto génico resultante de la transformación adenovírica de células murinas. Aunque fue considerado inicialmente como un oncogen, p53 es capaz de inhibir el fenotipo neoplásico de células tumorales portadoras de un *TP53* mutado. El gen *TP53* se encuentra mutado en un 50% de los carcinomas de colon, pulmón, mama, cerebro

y riñón. Normalmente esta mutación está asociada a una pérdida del alelo silvestre de TP53. La mutación de *TP53* en la línea germinal da lugar al síndrome de Li-Fraumeni que se traduce en una predisposición a múltiples tumores, como sarcomas, cáncer de mama y tumores cerebrales (Malkin y cols,1990). La función de p53 es parar el ciclo celular en la fase G1 o programar la muerte celular en respuesta a estímulos como son el estrés celular, daño del DNA, hipoxia, choque térmico, cambio de pH, etc (Prives y Pa, 1999). Desde el punto de vista bioquímico, p53 se comporta como un factor de transcripción que controla la expresión de otros genes, entre los que destacan la proteína pro-apoptótica Bax, el inhibidor de CDKs, (p21^{Cip1}) CDKN1A y la ubiquitina ligasa mdm-2 la cual inhibe a su vez a p53 a modo *de feed back* negativo (Prives y Hall, 1999).

A diferencia de otros muchos genes supresores de tumor, la proteína p53 mutada es más estable y se acumula llegando a alcanzar niveles bastante elevados, detectables fácilmente por técnicas de inmunohistoquímica. Los tumores positivos para p53 normalmente expresan un p53 mutado (Bookstein y cols,1993). La mayoría de tumores de próstata positivos corresponden a tumores recurrentes o metástasis hormono independientes. Este hecho sugiere una implicación de p53 en la progresión tumoral en etapas avanzadas (Navone y cols,1993). De hecho, se ha sugerido que las células portadoras de p53 mutada son seleccionadas clonalmente durante el proceso de metástasis del cáncer de próstata (Navone y cols,1999).

C-myc: la expresión de c-myc está aumentada en cáncer de próstata. Es un regulador de la proliferación y crecimiento celular a través de su acción sobre el ciclo celular, apoptosis, metabolismo, diferenciación y adhesión celular (Dang y cols,1999).

EGR-1 (*early growth response gene 1*): su expresión está aumentada en cáncer de próstata y puede modular la proliferación prostática mediante la estimulación de proto-oncogenes o factores de crecimiento que están implicados en el fenotipo tumoral (Thigpen y col 1996, Eid y cols,1998).

La expresión del factor de transcripción **ETS2** también está aumentada en cáncer de próstata. Está implicado en la regulación del ciclo celular a través de su regulación de la expresión de cdc-2 y ciclina D1(Sementchenko y cols,1998).

- Citoquinas y factores de crecimiento

Las citoquinas modulan el crecimiento celular, la diferenciación y la respuesta inmune y son indispensables en la interacción entre las células y la matriz extracelular. Actúan a través de receptores celulares y su correcto funcionamiento es imprescindible para mantener el equilibrio homeostático de la célula. Entre ellos se encuentra el factor de crecimiento de fibroblastos 8 (**FGF8**), que está sobreexpresado en en estadios avanzados del cáncer de próstata (Dorkin y cols,1999); el factor de crecimiento transformante beta (**TGF β**) que es miembro de la familia de factores de crecimiento polipeptídicos y actúa como supresor tumoral en las células normales

mediante la inhibición de la proliferación celular o mediante la inducción de proceso de diferenciación celular o la apoptosis. En las células tumorales, han sido descritas mutaciones en la vía de señalización de esta proteína que confieren resistencia a la inhibición del crecimiento llevada a cabo por TGF β . Estas mutaciones se han asociado a una mayor capacidad invasiva y metastatizante del tumor, mediada por una estimulación de la angiogénesis, migración celular, inhibición del sistema inmune y aumento de las interacciones entre las células tumorales y la matriz extracelular (Blobe y cols,2000).

Los miembros de la familia de factores de crecimiento transformantes (TGF-) y epidérmicos (EGF) presentan niveles de expresión superiores en cáncer de próstata respecto a tejido normal o hiperplásico. Este hecho querría decir que la regulación autocrina de las células prostáticas en crecimiento variaría dependiendo de las distintas patologías prostáticas (De Miguel y cols,1999)

La familia de receptores quinasa ErbB/EGF-R. Está compuesta por cuatro miembros, *ErbB1*, *ErbB2*, *ErbB3* y *ErbB4*. ***ErbB1*** es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), pese a que se encuentra sobreexpresado en cáncer de próstata no presenta amplificación génica. La disminución de su expresión inhibe el crecimiento de las células tumorales prostáticas (Bos y cols,1997). El oncogen ***ErbB2***, llamado también HER-2/neu o c-erbB2 (receptor de EGF humano 2), codifica para una glicoproteína de membrana que comparte una elevada homología con el receptor de EGF. *ErbB2* se encuentra amplificado y sobreexpresado en un 20-30% de tumores mamarios y se correlaciona con un peor pronóstico (Ross y Fletcher, 1999). Sin embargo, salvo algunas excepciones (Ross y cols,1993), en cáncer de próstata no se encuentra amplificado aunque sí sobreexpresado en una proporción baja de CPs. No presenta ninguna correlación con el grado histológico del tumor (Osman y cols,2001). ***ErbB3*** se expresa en la mayoría de tumores de próstata primarios y metastásicos. Requiere de la dimerización con otros miembros de su familia para ser activo. Su ligando, heregulin (HRG) o neuregulin (NRG) está presente en un 36 % (Leung y cols,1997) de tumores de próstata y la interacción entre ambos está implicada en estadios avanzados del tumor y correlaciona con peor pronóstico (Carraway y col , 1994).

Los factores de crecimiento IGFs (*insulin-like growth factors*) son potentes reguladores del crecimiento celular y tisular que actúan mediante mecanismos tanto autocrinos como paracrinos. Sus acciones están mediadas por el receptor IGF tipo 1 (IGF-1R) que es una tirosina quinasa muy parecida al receptor de insulina. La interacción entre las IGFs y el receptor IGF-1R está regulada por las proteínas de unión a IGF, IGFbps. El factor de crecimiento **IGF-1** estimula la proliferación celular y reduce la apoptosis tanto en células normales como tumorales del epitelio prostático (Cohen y cols,1994). Se ha observado cierta correlación entre los niveles séricos de este factor de crecimiento y el riesgo de desarrollar cáncer de próstata. En pacientes con cáncer de próstata los niveles séricos son alrededor de un 7-8% superiores (Grimberg y Cohen, 2000).

La regulación de los niveles de IGF-1 es compleja, en esta parecen participar tanto factores genéticos como ambientales (Chan y cols,1998). La proteína de unión a IGF-1, **IGFBP-3** inhibe el crecimiento celular mediante el bloqueo de la acción de IGF-1. Se ha observado que factores inhibidores del crecimiento, como el factor de crecimiento transformante TGF-beta y el gen supresor tumoral p53, aumentan la expresión de IGFBP-3 (Rajah R y col 1997) y parece ser que esta puede actuar directamente sobre el crecimiento celular independientemente de IGF-1 (Cohick y Clemmons, 1993; Grimberg y Cohen, 2000). El aumento de expresión de otro miembro de la misma familia de proteínas, IGF2, ha sido asociado con la progresión tumoral hacia estadios metastásicos (Mita y cols,2000).

El factor de crecimiento del endotelio vascular (**VEGF**), es una citoquina angiogénica que estimula el crecimiento de las células endoteliales y es uno de los principales factores implicados en la angiogénesis de tumores sólidos, como es el caso del cáncer de próstata. Su actividad está mediada por los receptores tirosina quinasa de las células endoteliales FLT-1 (*colony stimulating factor 1 receptor*)-like tyrosine kinase, el receptor KDR y su homólogo en ratón FLK-1 (*fetal liver kinase 1*) y un tercer receptor idéntico a la proteína neuropilin-1 humana. Los niveles séricos de VEGF aumentan en pacientes que presentan metástasis prostática (Duque y cols,1999) o que se encuentran en una fase andrógeno-independiente (Jones y cols,2000).

Vitamina D: la vitamina D (1,25-dihidroxitamina D), es un potente agente antiproliferativo e inductor de diferenciación en la próstata que realiza su acción a través de su receptor VDR. El primer estudio que relacionó los niveles de Vitamina D con el riesgo de padecer cáncer de próstata se realizó en 1995 por Corder y col. En este estudio observaron que los niveles de vitamina D eran inferiores en los individuos que presentaban cáncer de próstata respecto a la media normal (Gann y cols,1996). Posteriormente, se observó que una ingesta elevada de calcio aumentaba el riesgo de cáncer de próstata. Este evento sugirió que el calcio actuaría suprimiendo la conversión de 25-hidroxitamina D a 1,25- dihidroxitamina D (Giovannucci y cols,1998a). **VDR**, el receptor de la vitamina D, presenta varios polimorfismos y parece que estos están asociados con el riesgo a padecer cáncer de próstata. Estos polimorfismos varían dependiendo del área geográfica y se han empezado a considerar como un nuevo factor etiológico del cáncer de próstata (Correa-Cerro y cols,1999). Además de inhibir el crecimiento celular, otra de las acciones de la vitamina D, mediada por VDR es el incremento de los niveles de la proteína de unión a IGF-1, IGFBP (*insulin-like growth factor binding protein*). Este hecho sugiere que tal vez ambas vías, vitamina D e IGF, estén actuando conjuntamente (Chokkalingam y cols,2001).

A excepción del receptor VDR, que es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares que pueden actuar como factores de transcripción inducibles por ligando y modular así la transcripción de aquellos genes con un elemento respuesta VDRE en su región reguladora, el resto de factores presentados como son EGF, TGF- α , FGF8, ErbB1, IGF-1 al unirse a sus receptores tirosina quinasa, inducen la activación de una serie de vías de señalización celular como son la vía PI3K/ AKT en la que participa la proteína PTEN, la vía Shc/MAPK en la que participa la proteína Ras (Figura 15), la vía PLC- γ / PKC que también deriva en la activación del complejo AP-1 al igual que la vía Shc/MAPK y la vía de los STATs (*signal transducers and activators of transcription*) que aumenta la expresión de p27 e induce la parada del ciclo celular en G0.

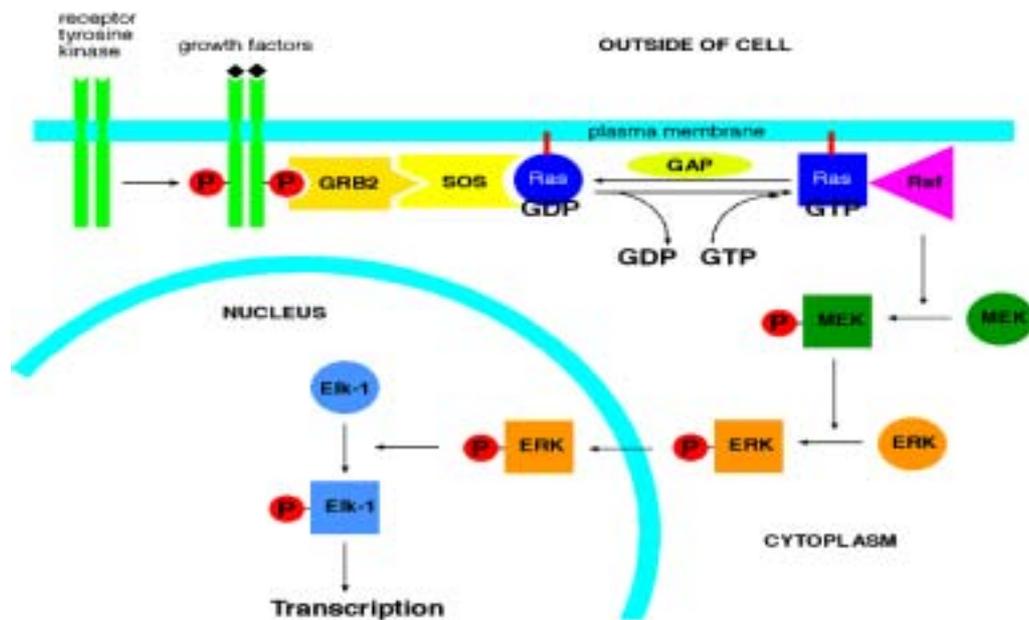


Figura 15. Vía de señalización de Ras. La unión de factores de crecimiento a los receptores tirosina quinasa estimula la autofosforilación de estos, que en consecuencia se unen a la proteína adaptadora GRB2 la cual, a su vez, retiene SOS en la membrana plasmática. SOS es el factor responsable de desplazar el GDP de Ras permitiendo así la unión de GTP (Ras permanece todavía unido a la membrana plasmática a través de lípidos añadidos postraduccionalmente). El complejo GTP-Ras activa a Raf. Raf, en consecuencia, inicia una cascada de fosforilación de proteínas, la primera de ellas es MEK (MAPK/ERK quinasa). La proteína MEK fosforilada, fosforilará a ERK (*extracellular receptor-stimulated kinase*) y esta, se translocará a núcleo donde fosforila a un determinado número de factores de transcripción, entre los cuales se encuentra ELK-1 que en consecuencia aumentará la expresión del complejo AP-1 (fos, jun y jun B) y c-Myc (fosforilado por MAPK). Ambos inducen la entrada en fase S mediante la activación de la ciclina D. La actividad de Ras puede revertir mediante la hidrólisis de GTP a GDP llevada a cabo por las proteínas activadoras de GTPasas GAP.

Otras moléculas implicadas en el desarrollo del cáncer de próstata son los péptidos bioactivos bombesina y endotelina-1. Ambos actúan a través de receptores asociados a proteína G de alta afinidad. De esta manera, median un amplio espectro de actividades celulares asociadas a la unión a receptores acoplados a proteína G, como sería la transducción de señal vía movilización del calcio intracelular. La bombesina estimula el crecimiento de las células prostáticas tumorales, potencia la capacidad invasiva del tumor e incrementa los niveles de expresión de uPA (*urokinase plasminogen activator*). La endotelina 1 induce la proliferación de los osteoblastos. Sus niveles de expresión también aumentan en tumores prostáticos que se encuentran en una fase avanzada. La expresión de su receptor (receptor B de endotelina, ETB), disminuye en cáncer de próstata y parece ser debido a metilaciones en las islas CpG del gen. Por este motivo, se ha supuesto que la actividad de endotelina en el cáncer de próstata está mediada por el receptor A (ERA). La aplicación de la inhibición del receptor A de la endotelina se encuentra en fase clínica I y por el momento, ha conseguido disminuir los niveles séricos de PSA y el dolor del paciente (Nelson y Carducci, 2000a, b). Estos péptidos son degradados por la enzima endopeptidasa 24.11 neutral (NEP), cuya pérdida de expresión, produce un desequilibrio homeostático que potencia la progresión tumoral hacia estadios metastásicos independientes de andrógenos (Papandreou y cols, 1998).

- Adhesión celular

El gen **CDHI** (16q22): codifica para la proteína E-cadherina. La familia de las cadherinas son glicoproteínas transmembrana cuya variación de la expresión se ha implicado directamente en una variedad de procesos como morfogénesis, supervivencia y desarrollo tumoral (Rowlands y cols, 2000). Se ha observado que la disminución de la expresión de E-cadherina está asociada a la pérdida de diferenciación del tumor, aumento de metástasis y disminución en la vida media del paciente (Morita y cols, 1999; Richmond y cols, 1997; Vleminckx y cols, 1991). Parece ser que en cáncer de próstata esta disminución de expresión se da a nivel de transcripción debido a una metilación del DNA (Yoshiura y cols, 1995; Graff y cols, 1995).

C-CAM-1, (*Cell-adhesion molecula (CAM) isoform (I)*): codifica para una proteína de adhesión celular que se ha detectado en la población de células basales durante el desarrollo embrionario y se postula que podría estar implicada en el reconocimiento entre este tipo celular durante el desarrollo prostático (Kleinerman y cols, 1995). Se sabe que está implicada en la iniciación y progresión del cáncer de próstata. Se ha observado pérdida de su expresión en una etapa temprana del desarrollo tumoral sugiriendo que dicha molécula podría ayudar a mantener el estado diferenciado del epitelio prostático. De hecho, ya se están realizando los primeros ensayos de terapia génica con adenovirus para aumentar su expresión in vivo (Lin y Pu, 1999).

El gen **Maspina** (18q21) fue identificado mediante hibridación sustractiva y *differential display* como un inhibidor citoplasmático de serinas proteasas (*serpin-like protein*) regulado negativamente en cáncer de mama. Otros miembros de la familia de las serpinas son los inhibidores del activador de plasminógeno **PAI-1** y **PAI-2**, ambos son considerados también supresores metastásicos. La expresión exógena de maspina mediante transfección génica o la adición de proteína recombinante en células en cultivo inhibe la metástasis de células de mama in vivo o la capacidad invasiva y motilidad de células tumorales prostáticas in vitro (Pemberton y cols,1997; Sheng y cols,1996). Una de las proteasas diana de la Maspina es el activador tisular del plasminógeno (tPA).

- proteínas de membrana

El gen *Prostate specific membrane antigen*, **PSMA** (11p11) (O'Keefe y cols,1998) es una glutamato carboxipeptidasa de 750 aminoácidos con un peso molecular de 85 o 100 kDa (dependiendo de la modificación post-traduccional). Se expresa en la superficie de las células epiteliales prostáticas. Por Northern blotting no se ha detectado expresión en las líneas celulares tumorales de próstata PC3 y DU145 ni tampoco en los tejidos de riñón, hígado, pulmón, mama, pancreas, placenta, músculo esquelético, piel y testículo. Sí que se han observado ciertos niveles de expresión en glándulas salivales, intestino delgado y cerebro. Su localización celular varía dependiendo si la célula prostática es normal (localización en citosol) o tumoral (localización en membrana plasmática). El aumento de su expresión se ha asociado con la progresión tumoral del cáncer de próstata y con independencia de andrógenos. Sin embargo, su expresión es regulada negativamente por andrógenos en la línea celular LNCaP. Fue descubierto en 1987 por Horoszewicz y cols, quienes lo aislaron de la fracción de membrana de la línea celular LNCaP. PSMA fue descrito como el antígeno 7E11.C5 específico de tejido prostático. Se ha observado que los niveles séricos de este antígeno aumentan en cáncer de próstata. Gracias a sus propiedades de antígeno de membrana y a su asociación con la progresión tumoral, ha sido utilizado en amplios estudios de diagnóstico del cáncer de próstata y se están realizando ensayos (en fase clínica I y II) de inmunoterapia con péptidos específicos de dicho antígenos (Murphy y cols,1998).

- Actividad telomerasa

Los telómeros consisten en secuencias de DNA repetidas en tandem y localizadas en los extremos de los cromosomas eucarióticos. Estas repeticiones teloméricas se sintetizan mayoritariamente por un enzima compuesto por una o más subunidades proteicas y un componente de RNA. Este **enzima telomerasa** es una transcriptasa inversa que utiliza su propio componente RNA como molde para la síntesis del DNA que constituirá el telómero. Se ha

observado que en humanos esta telomerasa está presente a niveles bajos o prácticamente indetectables en la mayoría de tejidos somáticos. Sin embargo, estos niveles se detectan fácilmente en las células germinales y en un importante número (85%) de muestras tumorales. Las células somáticas con un déficit de actividad telomerasa, pierden fragmentos de secuencia telomérica en cada ciclo de replicación. Las células cuya longitud del telómero es demasiado corta, alcanzan el límite Hayflick de la replicación celular y entran en senescencia. Las células que mantienen unos niveles altos de actividad telomerasa, tendrían un número de ciclos de replicación ilimitado y no entrarían en senescencia. Esta última es una característica común entre las células cancerosas y germinales.

Concretamente en tejido normal de próstata no se detecta actividad telomerasa, a diferencia de las próstatas tumorales donde la actividad es elevada. En el análisis comparativo de células de tejido tumoral, hiperplásico y normal (adyacente al tumoral) todas ellas pertenecientes a la misma pieza quirúrgica, se observó que la longitud de los telómeros de las células tumorales era inferior a la de las células hiperplásicas y normales. Sin embargo, entre estas últimas no se hallaron diferencias (Scates y cols,1997; Lin y cols,1997; Sommerfeld y cols,1996; Kim y Hruszkewycz, 2001).

OBJETIVO DE LA TESIS

Como todos los tumores, la evolución del cáncer de próstata también sigue un proceso desde su inicio como un carcinoma *in situ* hasta el evento invasivo de la metástasis, que varía dependiendo del grado de diferenciación del tumor.

En estos últimos años también hemos entendido que la mejor manera de combatir la enfermedad del cáncer de próstata es conocer sus características y ya no sólo, las referentes a los cambios morfológicos que suceden en las glándulas epiteliales afectadas, sino también los cambios moleculares y genéticos responsables de los cambios fenotípicos y bioquímicos del cáncer. El conocimiento de los mecanismos moleculares por los que un tumor se establece y progresa nos permitirá caracterizar cada tumor y poder en un futuro suministrar un tratamiento específico para cada tipo de tumor, dependiendo de las alteraciones moleculares que presente.

Los desequilibrios moleculares provocados por la transformación celular, frecuentemente pueden ser detectados como un aumento o disminución de los niveles de expresión de determinados genes que en consecuencia, activan o inhiben vías celulares asociadas a funciones vitales de la célula. Algunos de los genes identificados están siendo estudiados en profundidad. Sin embargo, todavía falta mucho por descubrir y por este motivo, el objetivo principal de esta tesis ha sido ampliar la información mediante la identificación y caracterización de nuevos genes implicados en el desarrollo del cáncer de próstata.

Este objetivo principal contempla los siguientes aspectos:

- Búsqueda de genes con niveles de expresión aumentados o disminuidos en cáncer de próstata.
- Identificación y caracterización del/os gen/es encontrados.
- Comprobación de la asociación de los niveles de expresión del gen en cuestión con el fenotipo tumoral del tejido prostático.
- Demostración de la implicación del/os gen/es encontrados en el desarrollo y/o progresión del cáncer de próstata.

I. MUESTRAS

Las muestras provienen de pacientes sometidos a intervención quirúrgica, ya sea mediante prostatectomía radical (CP, ZBP), adenomectomía (HBP), cistoprostatectomía (normal) o extracción de órganos post-mortem (normal). Todas ellas, son procesadas dependiendo de su utilización posterior. En el estudio de expresión diferencial de genes se han utilizado un total de 23 muestras que incluyen: 11 próstatas tumorales en las que se han analizado los focos tumorales así como la zona benigna periférica anexa al tumor, 9 próstatas hiperplásicas de las cuales se ha obtenido muestra de hiperplasia benigna de próstata y tres próstatas de donantes de las que se ha obtenido muestra normal. En el estudio inmunohistoquímico se han utilizado un total de 68 muestras prostáticas parafinadas de individuos distintos.

En el estudio inmunocitoquímico se han utilizado 4 líneas celulares, tres de ellas son tumorales de próstata (PC3, LNCaP, PZHPV7) y la restante de riñón de mono verde (Cos-7) (America Type Culture Collection; ATCC, Manassas, VA).

Línea celular	<i>Origen</i>	Número ATCC
PC3	Adenocarcinoma de próstata de grado IV con metástasis ósea. Individuo de 62 años	CRL-1435
LNCAP	Biopsia del nódulo linfático supraclavicular afectado por metástasis de un individuo de 50 años	CRL-1740
PZHPV7	Células epiteliales de la zona periférica de tejido normal de un individuo de 70 años. Transformadas mediante la transfección del virus HPV18	CRL-2221
COS-7	Fibroblastos de riñón de mono verde africano. Transformado con SV40. Antígeno T positivo	CRL-1651

Tabla 3. Líneas celulares utilizadas. Procedencia y número de catálogo del ATCC (*American Type Culture Collection*)

Las muestras parafinadas que se han utilizado para el análisis inmunohistoquímico proceden del servicio de anatomía patológica del Hospital Vall d'Hebron (Dra. Inés de Torres) y del Hospital Clínico (Dr. Pedro Fernández).

Muestras prostáticas. Tejido congelado.

La manipulación del espécimen quirúrgico es realizada en un entorno estéril y procurando que el periodo de tiempo en el que la muestra se encuentra a temperatura ambiente sea el mínimo posible. Es importante mantener en todo momento una orientación adecuada de la próstata que nos permita identificar la zona donde se halla el tumor y, de esta manera, facilitar el estudio anatómo-patológico posterior. Para ello, el primer paso consiste en la localización y situación de las vesículas seminales (restos) a nuestra izquierda, siempre apoyando la próstata en su base (Figura 16). A continuación, realizamos un corte transversal de unos 5 cm de grosor; éste, a su vez, es fragmentado en cuatro o cinco secciones, dependiendo del tamaño de la muestra. Si la región tumoral o hiperplásica es fácilmente detectable, procuraremos acotarla para aislarla del resto de la muestra. Los fragmentos son incluidos en una solución crioprotectora (OCT) e inmediatamente sumergidos en nitrógeno líquido durante 10 seg. Las muestras son transportadas en nieve carbónica o en el mismo nitrógeno líquido y conservadas a -80°C .

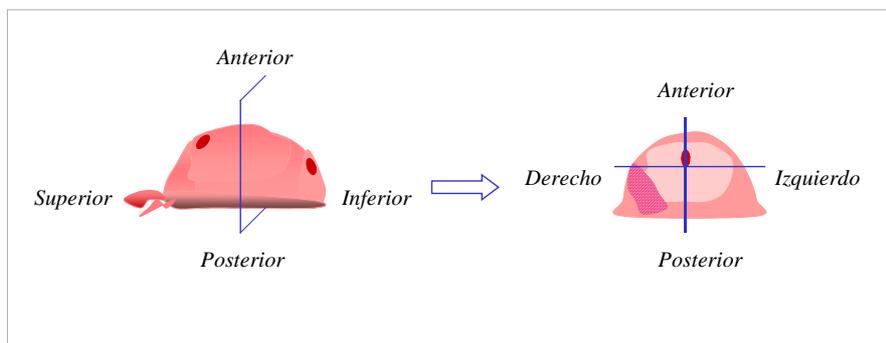


Figura 16. Manipulación de la muestra quirúrgica. En azul se señala el corte transversal y la sección resultante a partir de la cual, si no somos capaces de diferenciar entre la zona benigna periférica y la de transición, dividimos la muestra en cuatro fracciones, según se detalla en la figura. Si podemos diferenciar entre zona benigna periférica y de transición, entonces las separaremos para congelarlas por separado. Si se sospecha de la presencia de un foco tumoral, este se extrae y se congela por separado.

Debido a la característica multifocal de los tumores de próstata, es necesario un análisis preciso de la muestra con el fin de acotar la región tumoral y diferenciarla del resto de la sección, donde podemos encontrar tejido aparentemente normal y /o hiperplásico (que con certeza corresponde a la zona de transición). Manualmente resulta prácticamente imposible la separación entre las zonas afectadas por PIN y CP ya que, salvo en algunos casos, acostumbran a localizarse dentro de la misma región. La presencia de prostatitis también dificulta en mayor o menor grado la obtención de estas muestras tumorales. De un total de 50 próstatas tumorales

procesadas, únicamente han podido ser utilizadas 11 de ellas para el posterior estudio de expresión diferencial de genes.

El análisis patológico proporciona el grado de malignidad que presenta el tumor (suma Gleason), siempre contrastándolo con el diagnóstico que previamente se ha realizado de la biopsia del paciente correspondiente.

Se utiliza un criostato (-20°C) con el que se realizan microsecciones de 10 micras. Normalmente el número de microsecciones por muestra son 12 o 6, dependiendo del grosor de esta. Previamente, las muestras han sido atemperadas durante 20 min. a -20°C. Las microsecciones son fijadas en portaobjetos. Del número total de microsecciones fijadas, la primera y la última son teñidas con hematoxilina-eosina, según requiere el estudio anatómico-patológico. Las restantes microsecciones, acotadas por estas dos, son guardadas a -80°C para posteriores estudios. Los portaobjetos utilizados para la fijación de estas microsecciones, fueron tratados con polilisina para evitar que las muestras se desprendan durante su manipulación.

La tinción con hematoxilina-eosina consta de los siguientes pasos: hematoxilina, 2 min; eosina, 2 min; etanol 50%, 1 min; etanol 70%, 1 min; etanol 95%, 1 min; 2 x etanol 100%, 1 min; 2 x Xilol, 1 min.

Hematoxilina: se disuelven 5 g de hematoxilina en 50 ml de alcohol al 100%. Calentamos 1 L de agua destilada hasta 100°C; una vez iniciada la ebullición añadimos 100 g de aluminio potásico. Seguidamente, añadimos la solución de hematoxilina, mantenemos 1 min en ebullición y agitamos.

Eosina: realizamos una primera solución de 5 g de eosina en 250 ml de agua y una segunda solución de 5g de fluxina en 250 ml de agua. Mezclamos 30 ml de la solución de eosina con 3 ml de la solución de fluxina. Añadimos 234 ml de alcohol al 96%. A continuación añadimos 1.2 ml de ácido acético glacial

Tratamiento de los portaobjetos: Se inicia con una incubación en 0.1 N HCl durante 20 min. seguido de un aclarado en etanol absoluto. Después de dejarlos secar al aire, son incubados a 65°C durante 3 h en una solución 3X SSC, 1X Denhardt's. Tras aclararlos con agua destilada, son fijados durante 20min en una solución etanol: ácido acético (3:1). A continuación se dejan secar y se esterilizan a 180°C (estufa), mínimo 3 h.

100 x Denhardt: para 500 ml: 10 g Ficoll 400; 10 g polivinilpirrolidona MW 360000; 10 g BSA; H₂O. Guardar a -20°C.

20 x SSC: 3 M NaCl; 0.3 M Na-citrate

II. EXTRACCIÓN DE RNA

II.1 RNA total

El método que se ha utilizado en la extracción de RNA total es el descrito en 1987 por Chomczynski y Sacchi. La extracción se realiza a partir de 500 mg de muestra congelada. Se añaden a esta 5 ml de solución de homogenización (250 gr de guanidío isotiocianato, 17.6 ml de citrato sódico 0.75 M pH 7, 26.4 ml de Sarcosyl 10%) previamente mezcladas con β-mercaptoetanol (720 μl/100 ml). El proceso se realiza con un homogenizador (Polytron). A continuación se añaden 0.5 ml de acetato sódico 2 M pH 4,5 ml de fenol saturado en Tris-DEB*

y 1 ml de cloroformo-isoamilalcohol (49:1). Las muestras son incubadas a 4°C durante 15 min y centrifugadas a 12000 xg, a 4°C durante 30 min. Se recupera la fase acuosa (superior) y se añade un volumen de isopropanol frío (-20°C). A continuación se incuba durante 2 h a -20°C y se centrifuga nuevamente a 12000xg, a 4°C durante 20 min. Obtenemos así el precipitado de RNA. Los lavados del precipitado se realizan con 0.5 ml de etanol al 70% seguido de una centrifugación a 12000 xg, durante 10 min. Se decanta el etanol y el RNA se resuspende en el volumen adecuado de agua estéril. Previo a su utilización, el fenol saturado es incubado durante 1h a 4°C.

(*) Preparación de fenol saturado en Tris-DEB: el fenol es incubado durante 30 min a 65°C. Transcurrido este período, se le añaden 1.85 gr/l de 8-hidroxiquinoleína y 1 volumen de Tris-HCl 1 M a pH 7.5. La mezcla es incubada 2 h a 4°C seguido de 30 min a temperatura ambiente. Tras aspirar la fase superior, se añade nuevamente 1 volumen de Tris-HCl 10mM a pH 7.5 y se incuba a 4°C durante 24 h. Se repite el proceso de aspiración de la fase superior pero esta vez se añade 1 volumen de tampón de extracción de DNA (DEB) que está compuesto de lo siguiente: 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.15 M NaCl, 2 mM EDTA pH 8.0

A continuación el RNA es tratado con DNasa I, con el fin de degradar el posible DNA contaminante. Se procede a la digestión de 5 µg de RNA con 20 U de Dnasa I durante 4 h a 37°C. El volumen final de la reacción son 25 ml a una concentración 25 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA y a pH final de 7.2.

II.2 RNA mensajero

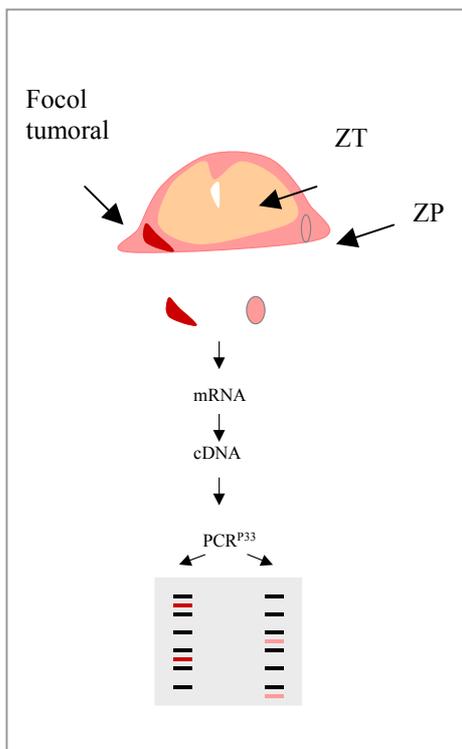
Para la obtención de RNA mensajero se ha utilizado el kit comercial QuickPrep Micro mRNA Purification Kit (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), que combina las propiedades del tiocianato de guanidinio (GTC) con la velocidad y selectividad del oligo(dT)-celulosa. El proceso de extracción parte del tratamiento de la muestra (previamente pulverizada en nitrógeno líquido) con una solución rica en GTC, asegurando así una rápida inactivación de las RNasas endógenas. El extracto es diluido tres veces para reducir la concentración de GTC hasta unos niveles apropiados que permitan la unión entre la cola poly(A) del mRNA y el oligo(dT) anclado a celulosa y que al mismo tiempo mantengan inhibidas las RNasas. La última etapa consiste en unos lavados con soluciones salinas de elevada concentración seguidas de lavados de baja concentración en sales. Finalmente, el material poliadenilado se recupera mediante la dilución con el tampón apropiado.

III. SÍNTESIS DE cDNA POR TRANSCRIPCIÓN INVERSA.

El volumen final de la reacción es de 50 μ l. Se parte de 100-150 ng de RNA mensajero o 1-1.5 μ g de RNA total. El cDNA es obtenido a partir de una reacción llevada a cabo por una enzima retrotranscriptasa (MoMLV, 2U/ μ l). Para ello, se utiliza como cebador un oligo(dT) a una concentración final 1 μ M y 0.2 mM de desoxinucleótidos. La reacción es tratada con un enzima inhibidor de Rnasas (Rnasin), 0.8 U/ μ l de reacción. La primera etapa de la reacción consiste en una incubación a 70°C durante 10 min. del RNA y el oligo(dT), con el fin de deshacer las posibles estructuras secundarias. A continuación, añadimos el resto de reactivos a la concentración correspondiente y mantenemos la reacción a 37°C durante 1 h, seguido de una última incubación a 95°C durante 10 min. El cDNA se mantiene a -20°C hasta su uso en reacciones posteriores.

IV. RNA-BASED ARBITRARILY-PRIMED PCR (RAP)

IV. 1 Técnica del RAP



Se ha utilizado esta técnica con el fin de buscar posibles genes asociados a la patología tumoral prostática. Para ello, se ha partido de tejido prostático congelado a partir del cual se ha acotado el foco tumoral y otra región de la misma próstata morfológicamente normal. A partir de ambas muestras se ha extraído RNA mensajero.

Figura 17. Esquema del proceso seguido. Las bandas señaladas en distinto color son las que posteriormente se aíslan debido a su presencia / ausencia (o simplemente aumento o disminución de los niveles de expresión) en una u otra población.

La técnica consiste en una RT-PCR que utiliza como cebador un sólo oligonucleótido al azar, el cual se une al cDNA a una temperatura óptima inferior a la que le correspondería, de

manera que podamos obtener un patrón de bandas reproducible en la misma muestra y al mismo tiempo diferencial entre las muestras a comparar.

La transcripción inversa parte de RNA mensajero, tal y como ha sido detallado en el punto anterior. Para la reacción de PCR utilizamos 5 μ l del producto retrotranscrito. Las concentraciones finales de los componentes de la reacción de PCR, para un volumen final de 25 μ l son las siguientes:

- 1X del Tampón correspondiente a la Taq;
- 1 μ M del oligonucleótido;
- 0.4 mM de desoxinucleótidos (dCTP+dGTP+dTTP);
- 0.3 ml α^{33} P dATP;
- 0.5 U de Taq polimerasa.

La reacción es llevada a cabo en un termociclador Perkin-Elmer 2400, (California, USA). El programa seleccionado es el siguiente:

- 1 ciclo: 94°C-5 min.
- 2 ciclos: 94°C-5 min / 40°C-5 min / 72°C-5 min.
- 40 ciclos: 94°C-1 min / 60°C-1 min / 72°C-2 min.
- 1 ciclo: 72°C-7 min.
- 4°C, ∞ .

El producto de la reacción es cargado en un gel al 6% de acrilamida / 8 M de Urea, a 35W durante 3 h, en Tampón TBE. (*Tris-borato EDTA*). Tras la electroforesis, se seca el gel durante 1h en un secador de geles. A continuación exponemos el gel en un film (Kodak) el tiempo necesario y revelamos. La comparación se realiza entre los carriles correspondientes al RNA del foco tumoral (*t*) y las muestras correspondientes al área aparentemente normal (*n*) del mismo paciente. Los criterios de selección considerados son dos: 1) que esté presente en (*t*) y no en (*n*), 2) que esté presente en (*n*) y no en (*t*). Posteriormente, una vez aislada la banda seleccionada, se comprueba si esta diferencialidad puede extenderse a un mayor número de pacientes. Al comparar las dos poblaciones de un mismo paciente, evitamos resultados erróneos debidos al polimorfismo existente entre individuos.

IV.2 Aislamiento y caracterización inicial de las bandas del RAP

Una vez obtenido el patrón diferencial y seleccionadas las bandas de interés, se procede a su extracción del gel de poliacrilamida. Para ello se superponen el film revelado, donde se visualizan los diferentes patrones, sobre el gel de poliacrilamida. A continuación, se marcan con una aguja los extremos de la banda/s de interés y de sus complementarios negativos; es

decir, el correspondiente a la misma altura en la muestra en la que no se observa banda. Ayudándonos con un bisturí, se recortan las bandas y se sumergen en 50 µl de solución TE (Tris/EDTA: 50 mM Tris, pH 8.0; 20 mM EDTA), incubándolo durante 2 h a 65°C. Transcurrido este periodo, se centrifuga durante 20 seg y recuperamos el sobrenadante. Este se conserva a -20°C hasta su uso.

Con el fin de estar seguros de que hemos aislado una única banda y para comprobar que no se encuentra en el fragmento complementario correspondiente a la población contraria, se amplifica la banda aislada utilizando el mismo "primer" con el que se realizó el RAP. Si se da el caso de que amplificamos más de una banda, recortamos la de interés o en su defecto, las dos y se vuelve a reamplificar hasta obtener una única banda aislada. La concentración final de los distintos componentes se mantiene igual que la utilizada anteriormente en la PCR del RAP, a excepción de las unidades de Taq (0.5 U/reacción). La reacción parte de 5 µl de la banda eluída en TE. La segunda reamplificación (si es necesaria) parte de 10 µl de la PCR anterior. El programa de PCR es el siguiente:

- 1 ciclo: 94°C-5 min.
- 35 ciclos: 94°C-15 seg./ 60°C-30 seg./ 72°C-30 seg.
- 1 ciclo: 72°C-7 min
- 4°C, ∞.

Tras la primera amplificación, separamos por electroforesis 10 µl del producto en un gel de agarosa al 2%. Es aquí donde se realiza una primera selección de las bandas de interés. Para ello, miramos que mantengan el patrón de "escala" esperado (Figura 18), correspondiente a los distintos tamaños de las bandas. Las bandas que amplifican con un tamaño distinto al previsto son descartadas. Si se da el caso de que entre las muestras de interés existe alguna que amplifica dos bandas, y si lo creemos conveniente, recuperamos las dos, o bien la que mejor se corresponda al patrón de escala. A continuación, reamplificamos de nuevo las bandas seleccionadas para cerciorarnos de que se trata de una única banda.

Esta banda, tras un proceso de ligación-transformación y extracción de DNA plasmídico (Kit "TA Cloning" de Invitrogen (Nuleek, Holanda), será secuenciada.

Para corroborar que verdaderamente existe una expresión diferencial entre las muestras se llevan a cabo dos procedimientos: amplificación de la banda aislada y de su negativo en la población contraria utilizando el mismo oligonucleótido que en el RAP y una vez conocida la secuencia, y sintetizados los primers específicos para esta, se realiza una RT-PCR de la muestra del paciente del cual se ha aislado la banda (Figura 18). Una vez comprobada su expresión diferencial, se realiza un estudio retrospectivo con un número significativo de pacientes

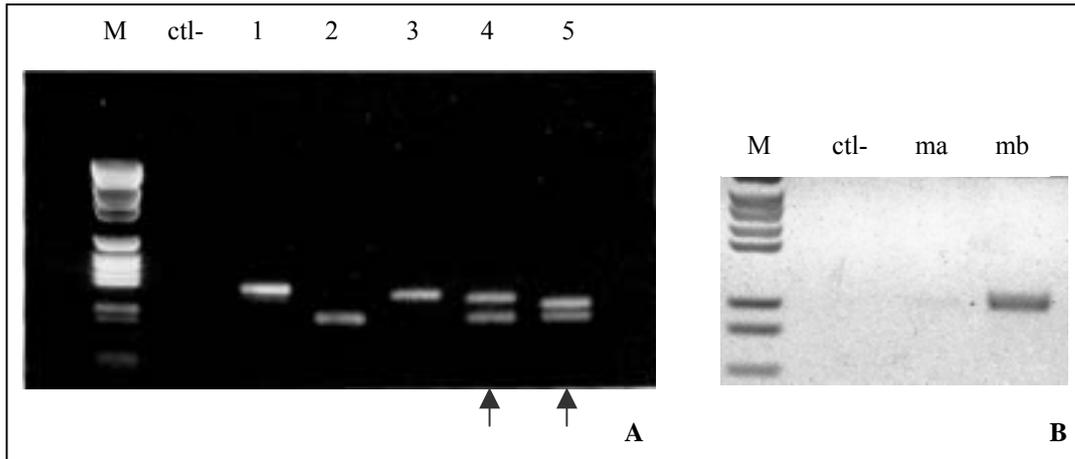


Figura 18. A) Patrón escala obtenido de las distintas bandas seleccionadas del gel y posteriormente amplificadas. Si tras amplificar obtenemos más de una banda (flechas en la imagen), estas se vuelven a aislar hasta lograr amplificar una única banda que será la que posteriormente se clonará. M (marcador de peso molecular), ctl- (control negativo de la reacción de PCR). Los distintos números (1-5) corresponden a bandas aisladas del gel del RAP y amplificadas posteriormente. B) una vez diseñados primers específicos para la banda de cDNA aislada y secuenciada, el primer paso es comprobar que verdaderamente esta banda tiene un patrón de expresión diferencial entre las dos muestras que originalmente se compararon en el RAP. Así, ma y mb corresponden a las muestras que se utilizaron en el RAP inicial. Tras realizar esta prueba, ya puede realizarse el estudio en un mayor número de muestras que corroboren el resultado.

IV.3 Subclonaje de las bandas del RAP

Proceso de ligación/transformación. Kit "TA Cloning" de Invitrogen (Nuleek, Holanda)

Ligación: el vector consiste en un plásmido de 3932 pares de bases (pCR™ II), que confiere resistencia a kanamicina y a ampicilina. La cantidad (ng) de inserto requerida por la reacción de ligación es directamente proporcional a su longitud. Así, para conocerla exactamente, aplicamos esta fórmula:

$$X_{ng\ prod.PCR} = (bp\ producto)(50ng\ vector) / (3932bp\ vector)$$

La relación vector:inserto utilizada es de 1:3. La reacción utiliza 50 ng de vector y 4 U de DNA ligasa T4 en un volumen final de 10 µl 1X del Tampón correspondiente. La reacción se incuba durante toda la noche a 14°C. Una vez finalizada, se mantiene a -20°C hasta la transformación.

Transformación: células competentes INVaF': *E.coli*, de genotipo endA1, recA1, hsdR17, supE44, λ-, thi-1,gyrA,relA1, φ80 lacZYA-argF), deoR⁺, F'. Con una eficiencia de transformación > 1.0 x 10⁸ (amp^R)/µg pUC18.

La transformación se realiza mediante choque térmico. El proceso se inicia con una incubación en hielo durante 30 min de las células competentes, 2 µl de β-mercaptoetanol 5 M y 6 µl del producto final de ligación, seguida de una rápida incubación durante 30 seg a 42°C.

Transcurrido este corto período, se depositan inmediatamente en hielo durante 2 min. Añadimos entonces 250 µl de medio de cultivo LB e incubamos durante 1 h a 225 rpm a 37°C. Repartimos el volumen final en tres placas de LB + Amp (50 µg/ml) en las que hemos extendido 40µl de X-Gal (40 mg/ml). Incubamos durante toda la noche (17 h) a 37°C.

V. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

V.1 Vectores utilizados

Nombre del vector plasmídico	Tamaño (Kb)	Cebadores	Confiere resistencia a
pCR2.1 (invitrogen)	3.9	M13 / T7	Amp
pEGFP-C1/pEGFP-N1	4.7	específicos	Kan / Neo
pCDNA3.1 HisA	5.4	T7 / pCDNA 3.1BGH reverse	Amp
pCDNA3	5.4	T7 / SP6	Amp
pCMV HA	3.8	pCMV (comercial)	Amp
pGEM-T	3.0	T7/SP6	Amp
pGEX 6-P-3	4.9	pGEX F-R (comercial)	Amp
pACT2	8.1	específicos	Amp
pBD-Gal4	6.485	específicos	Amp

Tabla 4. Vectores utilizados

V.2 Transformación por electroporación

V.2.a Preparación de células (bacterias) competentes (*E. coli*: XL1-blue o DH5-α)

Sembrar bacterias, seleccionar colonias y crecer en 20 ml de LB. Crecer en 300 ml a 37°C 225-250 rpm hasta llegar a una densidad óptica (OD) a 600 nm de 0.5-1.0. Determinar la OD cada 20 minutos. Incubar el cultivo durante 30 minutos en hielo y centrifugar a 4°C a 4000xg como máximo, durante 15 minutos. Resuspender el botón en 1 L de agua fría y centrifugar. Resuspender el botón en 500 ml de agua fría y volver a centrifugar. El botón resultante se resuspende en 20 ml de glicerol al 10 % frío y se vuelve a centrifugar. Finalmente se resuspende en un volumen de 2-3 ml de glicerol 10% y se hacen alícuotas de 50 µl. La concentración es de $1-3 \times 10^{10}$ células / ml

V.2.b Transformación

Se trabaja a partir de dos diluciones del plásmido en cuestión con el fin de obtener la máxima eficiencia (1 ng/ml y 0.1 ng/ml). Se añade 1 ml de dichas diluciones a 40-50 µl de células competentes y se incuba 1 minuto en hielo. El volumen es pipeteado en la cubeta de electroporación. Se seca la cubeta y se introduce en el soporte de electroporación. El proceso se realiza a 250V. Inmediatamente se añade 1 ml de medio enriquecido Soc o medio LB y se pasa a un tubo para incubarlo 45 minutos a 37°C y 225 rpm. Transcurrido este periodo el producto es sembrado en medio LB con el antibiótico al que el plásmido confiere resistencia.

Se transforma: 2-5 µl de cada ligación; 3 µl de la ligación control negativa (plásmido digerido sin inserto); 75 ng de vector no ligado; 10 pg de plásmido supercoiled.

V.3 PCR de comprobación del proceso ligación-clonación

Se seleccionan las colonias blancas recombinantes. Para asegurar la existencia del inserto, se hacen crecer en 2 ml de LB + Ampicilina (50µg/ml) durante 7 h, a 37°C, 225 rpm. Tras esta incubación, 20 µl de cada cultivo son centrifugados durante 15 seg. Tras descartar el sobrenadante, se añaden 50 µl de agua y se hierve durante 10 min. Se centrifuga durante 5 min. Finalmente, el sobrenadante se decanta en un tubo de microcentrífuga nuevo.

Condiciones de la PCR: Como cebadores, se utilizan los oligonucleótidos del plásmido de los sitios T7 y SP6 que flanquean el inserto.

Programa: 94°C 1 min, 30 ciclos (94°C 15 seg, 60°C 10 seg, 72°C 15 seg), 4°C ∞.

El producto de PCR es cargado en un gel de agarosa al 1% para comprobar que existe inserto y que el tamaño amplificado se corresponde con el de la banda purificada.

Si el resultado es positivo, del cultivo bacteriano de 2 ml se cogen 100 µl y se hacen crecer a 37°C, 225 rpm, en 10 ml de medio líquido LB + Amp (50 µg/ml), durante 17 h.

V.4 Purificación del DNA plasmídico

La purificación del DNA plasmídico (“minipreps”) se realiza mediante el kit “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” de Promega (Madison. USA). Para ello, se parte de 5 ml del cultivo de noche en medio líquido. Se centrifuga a 4°C 10.000 g durante 5 min. Descartamos el sobrenadante. El botón se resuspende en 250 µl de la solución correspondiente. Se añaden 250 µl de solución de lisis celular. Se mezcla mediante inversión durante 4 min. Se añaden 10 µl de proteasa alcalina, tal como indica el protocolo. Tras mezclar por inversión y mantener durante 5 min, a temperatura ambiente, se añaden 350 µl de solución de neutralización. Se vuelve a mezclar por inversión y se centrifuga a 12.000x g , 10 min. a Temperatura ambiente. El volumen resultante se transfiere a una columna y se centrifuga a 12.000x g, 1 min. Entonces, se procede a los lavados. Se añaden 750 µl de solución de lavado. Tras centrifugar a 12.000x g 1min, se añaden 250 µl de la misma solución de lavado y se centrifuga de nuevo. La columna es transferida a un tubo nuevo. Entonces, se procede a la

recuperación del DNA plasmídico retenido en la columna; para ello se añaden 50µl de agua estéril libre de nucleasas y se centrifuga a 12000x g, 1 min.

Opcionalmente, si quiere comprobarse el buen estado del DNA plasmídico y de nuestro inserto, puede realizarse una digestión con enzimas de restricción y el resultado se carga en un gel de agarosa al 2%. Digestión de (2 h a 37°C) 4 µl del volumen final obtenido en la miniprep. En el caso de pCR2.1 los enzimas flanqueantes utilizados son: HindIII (5 U) y EcoRV (5 U).

VI. SECUENCIACIÓN

La secuenciación se realiza por el procedimiento de Sanger, usando didesoxinucleótidos derivatizados con fluorocromo (Big Dye, Applied Biosystems). Las reacciones parten de 300-500 ng de DNA plasmídico portador del inserto o de 100-200 ng de producto de PCR. Como primer puede utilizarse alguno de los primers universales contenidos dentro de la secuencia del vector (M13, T7, SP6) o alguno específico de la secuencia. La reacción es llevada a cabo por el enzima Taq polimerasa con un protocolo de secuenciación cíclica en un termociclador P-E 2000. Los productos se analizan por electroforesis capilar en un secuenciador ABI PRISM 310 de Perkin-Elmer (California, USA).

Análisis de la secuencia

Se realizaron análisis comparativos de las secuencias aisladas con bases de datos de secuencias accesibles públicamente (*Gen Bank*, *EMBL*). Mediante el algoritmo BLAST (Altschul, Stephen F y cols, 1997) se consultan las siguientes bases de datos: nr (no redundante GenBank + EMBL + DDBJ + PDB), dbEST (división del GenBank), base de datos específicos para diversos organismos. Los programas utilizados han sido blastn, blastx y tblastn. Los alineamientos múltiples se realizaron con el algoritmo CLUSTALW.

VII. RT-PCR SEMICUANTITATIVA

El método semicuantitativo se fundamenta en la realización simultánea de dos PCRs correspondientes al cDNA que se quiere estudiar y al cDNA control. Es un método semicuantitativo porque siempre el valor obtenido es relativo ya que viene dado por un segundo valor que corresponde a un gen de expresión constitutiva y que en principio no tendría que variar. La RT inicial es común a ambas PCRs y el volumen de partida es el mismo. Una vez realizadas, la validación de la expresión del cDNA problema se obtiene de la proporción entre esta y el cDNA control. Los niveles de expresión obtenidos de la RT-PCR se obtienen mediante densitometría (*Molecular analyst*, BioRad Gel Doc 1000), (California, USA). El principio de la técnica requiere que la amplificación nunca llegue a saturación; es decir, que tanto la cantidad de cDNA de partida como los ciclos establecidos en el programa sean los óptimos para que el resultado validado se corresponda con la fase exponencial de dicha amplificación.

VII.1 Diseño de oligonucleótidos

El diseño de los "primers" específicos (Tabla 5) se fundamenta en los criterios descritos en la literatura. Para ello se ha utilizado el programa oligo 4.0 (Manual: Rychlik, W. OLIGO, 4.0. Research GenetiAddress: Huntsville, Alabama, USA, 1989).

- La longitud de los primers diseñados varía entre 18 y 21 bases.
- El contenido en [GC] es igual o superior al 50%
- La base del extremo 3' es una guanina [G]o una citosina [C]
- No forman *heteroduplex*, sobre todo en su extremo 3'
- No forman bucles

VII.2 Normalización de la técnica de RT PCR semicuantitativa

Los resultados óptimos fueron obtenidos a partir de los 4 µl de la reacción de transcripción inversa. El número de ciclos seleccionado se detalla en las imágenes anteriores.

La concentración de los componentes en un volumen final de 25 µl es la siguiente: Tampón de la reacción 1x; Cl₂Mg: 1.5 mM; cebadores: 1 pmol/ml; dNTPs: 0.4 mM

El control utilizado es el cDNA para la proteína ribosomal s14r.

	NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')	Tm
RT PCR SQ	B14 up	CACCATCCTCCATGTTGCTG	59.4
	B14 low	TCTTCATTGGCCTCATCCCC	59.4
	B13 5'	TTGCGAAGGTGTGCGGAAAC	70.4
	B13 3'	AAGAATGTGGGATGTGCCGA	67.6
CONSTRUCCIÓN B14 sense en pCDNA3	UM23 5'	TCCCATCGGTCCCTCCTCAC	63.5
	B14-EcoRI-L	GGAATTCACCATCCTCCATGTTGCTG	66.5
CONSTRUCCIÓN B14antisense en pCDNA3	B14hind3AS'	CAAGCTTTGCTTGCGGGTGGTGAT	64.4
CONSTRUCCIÓN PROTEÍNA DE FUSIÓN GFP-PTOV1	PEGFPN-3'	CGCGGATCCGCGCCCCATCCCTCGTTG	87.6
	PEGFPN-5'	CGGGGTACCCCGATGGAAGGTGCTCGG	86.0
CONSTRUCCIÓN PROTEÍNA DE FUSIÓN BD-PTOV1 (YTH)	YTH-14	GGAATTCCCCATGGAAGGTGCTCGGGTC	80.3
	YTH2D14F	CGGAATTCAGGCCTGAGCCCAACAGTCGGTC	83.1
	YTH1D14R	TCCCCCGGGGACCGACTGTTGGGCTCAGG	87.3
	B14 UP	CACCATCCTCCATGTTGCTG	59.4
CONSTRUCCIÓN PROTEÍNA DE FUSIÓN GST-PTOV1	YTH-14	GGAATTCCCCATGGAAGGTGCTCGGGTC	
DETERMINACIÓN DE PTOV2	PTOV2-285U	GACGGACTTCGGGGGAGACTA	68.5
	PTOV2-1010L	CTTGTTGGAGAGGGGTGATGG	67.8
	PTOV2-UP	ATGGCAGCATTCCCAGCAGCC	74.4
	PTOV2-LW	AGGATGTCGTCTCCATGACG	68.5
DETERMINACIÓN EXONES/INTRONES DEL GEN PTOV1	E3F-B14	ACTCCAGTTGGCACAGTTCC	61.8
	E3R-B14	GAAGCCGTTGCCCATGATGCG	63.7
	E4F-B14	ATGCTGTTCCCCCACATCTCC	61.8
	E4R-B14	CCTGCTTGCGGGTGGTGATGA	63.7
	E5F-B14	GGCCCAGTCCAGATCGTCAAC	63.7
	E5R-B14	TCCTGCCACTCCATGACACCA	61.8
	E6F-B14	GCCTGAGCCCAACAGTCGGTC	65.7
	E6R-B14	TCTCCCCCTGGTTCACGTAG	61.8
	E8F-B14	ACCACCCTAGTGCCGCTGTTC	63.7
	E8R-B14	GCACAGGCTCTTCAGTGTCTC	61.8
	E9F'reverse	CTCACACGATGCTTTGTAGG	57.3
	UM235'	TCCCATCGGTCCCTCCTCAC	63.5
	LM233'	CCCATCCCTCGTTGCTGTTG	61.4
	B14 5'	CACCATCCTCCATGTTGCTG	59.4
	R1 b14	CTTGGCAGGGCAGGGTCCGCTTCA	69.6
R2 b14	TGCCTGCTTGCGGGTGGTGATGAC	67.8	
R3 b14	CTCTTGACCGACTGTTGGGCTCA	66.1	
EMT	EMTU	GCACCATGCCCTCCTTC	57.6
	EMTL	GCTCCTTCTTTCTGTCT	50.4
	EMTh-F	CACACTTATTCTTATGTTTGCTTG	55.9
	EMTh-R	GATAGCTCCTTCTTTCTGTCTTTG	59.3
	Kiaa0321-U	GACTGGCAGACCTTGAGGAG	64.0
	Kiaa0321-L	GCCAAGAAGTGAGAAGTGGC	62.0
	B13 5'	TTGCGAAGGTGTGCGGAAAC	70.4
	B13 3'	AAGAATGTGGGATGTGCCGA	67.6
S14r	S14rU	CAGGTCCAGGGGTCTTGGTC	63.5
	S14rL	GGCAGACCGAGATGAATCCTCA	62.1
Ciclofilina	Ciclofilina U	ATGGTCAACCCACCGTG	58.2
	Ciclina L	TGCAATCCAGCTAGGCATG	56.7

Tabla 5. Secuencias de los oligonucleótido utilizados.

VIII. FISH SOBRE CROMOSOMAS METAFÁSICOS.

Institut de Recerca Oncològica (M. Nadal, X. Estivill)

El primer paso consistió en generar una sonda de cDNA (1.2 Kb) de PTOV1 mediante RT-PCR sobre RNA procedente de tejido prostático (cebadores utilizados: UM23 y LM23). Esta sonda de cDNA fue hibridada contra una librería de BAC (bacterial artificial chromosome) genómica humana. Los clones positivos fueron analizados por PCR y secuenciados. Las sondas de DNA obtenidas a partir de estos vectores BAC fueron marcadas con biotina 16-dUTP, hibridadas toda la noche (12 h) a 37°C sobre cromosomas metafásicos y visualizadas con isotiocianato de avidina fluoresceína (Vector Laboratories, Burlingham, CA, USA).

IX. DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA EXÓN/INTRÓN DE PTOV1

A partir de la comparación de nuestra secuencia de cDNA con una secuencia de cDNA parcialmente procesado de la base de datos (# AL050131) y de análisis bioinformáticos se dedujeron los posibles puntos de splicing intrónico de la secuencia.

Programas bioinformáticos utilizados:

- Comparación de nuestra secuencia con la base de datos de todas las secuencias de nucleótidos (n) y de cDNAs parciales (dbest) mediante el algoritmo BLAST del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- Múltiple alineamiento entre distintas secuencias mediante el algoritmo Clustalw:
 - <http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html>
 - <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>
- predicción de secuencia codificante y traducción teórica a proteína.
 - <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>
- predicción de los sitios de corte y empalme entre exones / intrones.
 - <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/> (entrar en gene feature searches- programa HSPL).

Se estudió la secuencia de cDNA parcialmente procesado (# AL050131) que estaba disponible en la base de datos y se dedujeron las posibles regiones intrónicas. Una vez deducidos los sitios de unión entre exones e intrones, se diseñaron oligonucleótidos mediante el programa Oligo 4.0 específicos para las regiones flanqueantes de estos puntos teóricos de inserción con el fin de amplificar distintas regiones del gen y analizarlas por secuenciación. Las amplificaciones se realizaron sobre el vector BAC 173J1 portador del DNA genómico de PTOV1.

Condiciones de PCR

Se realizó una PCR *Hot Start* que consiste en separar la muestra a amplificar en el tampón de la Taq y tratarla previamente 5 min a 70°C. A continuación se añaden el resto de componentes, también en el tampón del enzima Taq y se procede a realizar la PCR. Ambas

fracciones, la que contiene la muestra y la que contiene la polimerasaTaq y el resto de componentes, están separadas por una bolita de parafina sólida. Con esto lo que conseguimos es que, tras la incubación a 70°C seguido de 4°C, la bolita de cera forma un tapón de manera que al añadir el resto de componentes, la Taq empezará a realizar su actividad al mismo tiempo sobre el total de la muestra y la eficiencia será mejor, también conseguimos que la muestra no se evapore.

El programa utilizado es el siguiente: 70°C 5 min; 4°C--; 35 ciclos (94°C 30 seg, 55-60°C 30 seg, 72°C 30 seg-1 min) 72°C; 4°C. Las concentraciones utilizadas de los componentes son similares a las ya descritas en las PCRs anteriores con la diferencia de que el enzima utilizado es la EcoTaq. Los primers utilizados flanquean los puntos de *splicing* intrónico.

X. NORTHERN BLOTTING

El entorno de trabajo debe estar libre de RNasas. Las soluciones y el material se ha tratado previamente con dietilpircarbonato (0.1%).

X.1 Preparación de la muestra

La cantidad de RNA de partida puede variar entre 1-2 µg de RNA mensajero (10-20 µg de RNA total). El proceso se inicia con la desnaturalización de la muestra de RNA. El RNA se incuba a 65°C durante 10 min en una solución que contiene formamida, formaldehído, MOPS y azul de bromofenol e inmediatamente se colocan en hielo.

X.2 Preparación del gel

El gel se prepara al 1% de agarosa. Se añaden 3 g de agarosa en 233 ml de agua libre de RNasas y se hierve. Una vez disuelta la agarosa, se deja enfriar hasta una temperatura próxima a los 40°C; entonces, se añaden (gota a gota) 15 ml de MOPS 20x y 52.5 ml de formaldehído 35%. Finalmente, se añaden 15 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). El RNA desnaturalizado se carga en el gel, y se procede a su separación por electroforesis.

X.3 Transferencia a membrana

El RNA separado electroforéticamente es transferido mediante el método de capilaridad descrito en 1975 por Southern. El dispositivo de transferencia consta de una fuente en forma de vasos comunicantes con tampón de transferencia, conectados entre sí por papel Whatman 3MM. Sobre estos se deposita el gel de agarosa y sobre éste, la membrana (HybondTM-N; nylon membrane" de Amersham Pharmacia Biothech, Reino Unido)*. Sobre la membrana se apoya una pieza de papel Whatman 3MM y sobre ésta un bloque de papeles de filtro comprimidos por

un peso. El efecto de capilaridad se consigue gracias al fluido del tampón de transferencia (2x SSC) desde la fuente que lo contiene hacia el grueso de papeles de filtro dispuestos sobre el gel de agarosa y la membrana de nylon. La transferencia se realiza durante la noche (de 17 a 20 h). Una vez transferido, el RNA se fija covalentemente a la membrana mediante radiación ultravioleta (UV Stratalinker™ 1800 de Stratagene, La Jolla, California, USA).

* Se ha utilizado también una membrana comercial Multiple tissue Northern (MTN™) Blot (Clontech laboratories, Palo Alto, California, USA), portadora de 2 µg de RNA mensajero de distintos tejidos.

X.4 Marcaje de la sonda

La sonda de cDNA se obtiene a partir de una amplificación de la banda con sus oligonucleótidos específicos seguido de una purificación del producto de PCR mediante el kit “QIAquick PCR purification kit” (Qiagen, Alemania). El marcaje se realiza mediante la técnica de “random priming”. Los componentes de la reacción son de la casa comercial Stratagene. El procedimiento es el siguiente: se parte de 25 ng de cDNA, este es llevado a un volumen final de 24 µl. Se añaden 10 µl de oligonucleótidos al azar. A continuación el cDNA y los oligonucleótidos son desnaturizados mediante una incubación de 5 min a 95-100°C, colocándolos a continuación en hielo. Se añaden 10 µl del tampón 5x, correspondiente a la enzima DNA polimerasa klenow Exo(-) (5 U/reacción). Este tampón contiene la concentración adecuada de los desoxinucleótidos dATP, dGTP y dTTP. El isótopo marcado se añade en exceso, 5 µl de α P³²dCTP. La reacción es llevada a cabo durante 1 h a 40°C. La purificación de la sonda marcada se realiza mediante filtración en columnas G50 Sephadex (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania).

X.5 Hibridación

El proceso de hibridación está dividido en tres partes. La primera consiste en un periodo de incubación en una solución 5x SSPE, 5x Denhardt y 0.5% SDS a la que se le añaden 0.5 mg de esperma de salmón sonicado que previamente se ha desnaturizado a 100°C durante 5 min. La incubación se realiza en tubos de hibridación dispuestos en un horno de hibridación a 65°C durante 1 h. Transcurrido este período, se añade la sonda marcada, también desnaturizada a 100°C durante 5 min y se inicia el período de hibridación que dura un mínimo de 12 h a 65°C. Finalmente, se procede a los lavados de la membrana los cuales consisten en una incubación durante 20 min en una solución 2x SSC a temperatura ambiente, una segunda incubación durante 20 min en una solución 1x SSC, 0.5% SDS a 65°C y la última, consiste en una incubación durante 20 min en 0.5x SSC, 0.5% SDS a 65°C, todas ellas con agitación. La membrana se cubre con papel de plástica procurando que no se seque para evitar que la sonda se una covalentemente al RNA y para facilitar el proceso de deshibridación. Una vez la membrana

ha sido expuesta sobre un film (Kodak) y revelada, se procede a su deshibridación. Para ello, la membrana se sumerge en agua hirviendo y se deja enfriar durante 10 min.

XI. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES DE CONEJO

XI.1 Generación de anticuerpos policlonales de conejo

El primer paso a realizar fue la selección de una secuencia de la proteína que correspondiera a una región con alta probabilidad de ser inmunogénica.

PTOV1: N- KRRPYSDESTAKLKR-C

EMT: N-RKKGDKALQLRRIAKC-C

Los péptidos sintetizados contienen en su extremo carboxilo un residuo de cisteína y fueron conjugados con KLH. El residuo de cisteína facilitó la purificación posterior del anticuerpo.

Se realizaron 4 inoculaciones con intervalos de tiempo de 10 días entre la primera y la segunda inoculación y de 20 días entre las restantes inoculaciones. La cantidad de péptido inyectado fue de 100 µg en una relación de igual volumen con el medio coadyuvante de Freund's. Dos días previos a la primera inoculación, se realizó un primer sangrado de 15 ml para la obtención del suero preinmune. Tras las dos primeras inoculaciones se realizó un segundo sangrado, siempre manteniendo un periodo de una semana tras la última inoculación. El tercer sangrado se realizó tras una semana de la tercera inoculación. El cuarto y último sangrado se realizó en tres días consecutivos, una semana después de la cuarta inoculación. Los niveles de anticuerpo obtenidos así como la especificidad de este fueron testados mediante la técnica de ELISA.

XI.2 ELISA (*placas Nunc Maxisorb*)

Con el fin de determinar si la inoculación del péptido en conejos había sido efectiva y el título de anticuerpos era suficientemente elevado, se utilizó la técnica de ELISA. Para ello, en cada pocillo se añadieron 50 µl de péptido (2 µg/ml) en PBS 1X pH 8.3 y se incubó a temperatura ambiente toda la noche en cámara húmeda. A continuación se realizaron 3 lavados con PBS 1X. El proceso de bloqueo consistió en una incubación durante 2 horas con BSA al 2% en PBS 1X pH 8.3 Tween-20 al 0.1% (PBS-T) (volumen total de 200 µl). Lavamos 2 veces con PBS-T. Una vez bloqueado se añadió el suero que quiere analizarse y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron varias diluciones (1/50, 100, 250, 500, 750, 1000 y 2000) en PBS 1X pH 8.3, Tween 0.1% (volumen total de 100 µl). Lavamos 3 veces con PBS-T e incubamos con el anticuerpo secundario (Monoclonal α-rabbit HRP de SIGMA) a una dilución 1:2000 (volumen de 100 µl) 2 horas a temperatura ambiente. Lavamos 3 veces con PBS-T y una

con PBS. Finalmente se incuba con el sust rato. Añadimos 5 pastillas OPD y 5 de Urea Hydrogen Peroxide / Tampón en 100 ml de agua milliQ. El sustrato disuelve protegido siempre de la luz y se añaden 200 µl por pocillo. Tras incubar 30 minutos, la reacción se paró con 50 µl de Hcl 3M. El resultado se leyó en un espectrofotómetro de placa a 492 nm

XI.3 Purificación de anticuerpo (*Kit SulfoLink, Pierce*)

El paso inicial consiste en acoplar a una columna el péptido sintético específico de nuestro anticuerpo. El péptido tiene que tener una cisteína terminal o un sulfhidrilo libre para asegurarnos de que no ha dimerizado. En nuestro caso los dos péptidos utilizados son portadores de un aminoácido cisteína terminal.

Acoplamiento del péptido a la columna: la posición de la columna ha de ser siempre vertical. Se añaden a la columna 2 ml del gel de acoplamiento (6% crosslinked, 50% agarosa en 10 mM EDTA, 0.05% NaN₃, 50% glicerol), se deja drenar el fluido hasta que el gel quede totalmente depositado. La columna se equilibra con 12 ml de solución A (50 mM Tris, 5 mM EDTA-Na pH8.5). Colocamos en la columna el tapón inferior y añadimos el péptido reducido previamente disuelto en 2-3 ml de solución A. Se mezcla durante 15 min mediante inversión suave y se incuba a temperatura ambiente 30 min. A continuación se deja drenar y la columna se lava con 6 ml de solución A.

Para comprobar que el péptido se ha unido se compara la absorbancia A280 del péptido diluido inicial con la del lavado. Como blanco se utiliza la solución A

Bloqueo de los sitios de unión no específicos: se disuelven 15.8 mg de L-cystein-HCl en 2 ml de solución A y se añade a la columna. Mezclamos durante 15 min y se deja incubando a temperatura ambiente 30 min. Tras drenar, la columna se lava con 1 M NaCl (4x4 ml) y 0.05% acida sódica (3x4 ml).

Aplicación de la muestra: previamente la columna se equilibra con la misma solución (6 ml) en la que está la muestra. En este caso, se han diluido 500 µl de suero inmune en PBS 1X. Se añade 1 ml de muestra y dejamos que drene hasta que entre totalmente en el gel (la capacidad del gel es de 1 ml). Se añaden 200 µl de solución M (0.1 M NaPO₄, 5 mM EDTA pH6.0), ponemos el tapón inferior y añadimos 1 ml más de solución M. Incubamos 1 h. La columna se lava con 16 ml de solución M.

Elución del anticuerpo: con 8 ml de una solución 100 mM glicina pH 2.5-3.0. Se recogen alícuotas de 1 ml. Normalmente el anticuerpo se recupera entre la 2ª y 4ª alícuota (comprobamos por A280). El eluido se neutraliza añadiendo 50 µl de 1M Tris pH 9.5. Dializamos las alícuotas de interés (contra PBS 1X). Tras la diálisis se determina la concentración final de anticuerpo mediante el kit de alta sensibilidad de Pierce (Micro BCA Protein Assay Reagent, PIERCE. Rockford, Illinois, USA). Para comprobar que la técnica se ha

<i>Pepstatina</i>	<i>Proteasas ácidas</i>	<i>1 mg/ml en metanol</i>
<i>PMSF</i>	<i>Serin proteasas</i>	<i>100 mM en isopropanol</i>
<i>Benzamidina</i>	<i>Serin proteasas</i>	<i>100 mg/ml</i>
<i>NaOva</i>	<i>quinasas</i>	<i>250mM</i>

Tabla 7. Inhibidores de proteasas

XII.1.a Extracción de proteína total

i. Tampón Laemmli tampón:

Tampón de carga Laemmli 2X

100 mM Tris-HCl (pH 6.8)

200 mM DTT (Ditiotreitol) (se prepara stock 1M y se guarda a -20°C)

4 % SDS

0.2 % Azul de bromofenol

20 % Glicerol

Se lavan las células varias veces con PBS 1x pH 7.4. Las células se rascan con tampón Laemmli 1X (que puede estar previamente calentado a 85°C), una vez rascadas, se pasan varias veces por una jeringa de insulina (la muestra siempre en hielo), se incuban durante 3-5 min a $85-90^{\circ}\text{C}$ y se centrifugan durante 5 min. Se pasa el sobrenadante a un tubo nuevo. Puede añadirse DTT en el momento (concentración 100 mM) o esperarse justo antes de cargar la muestra en el gel. Para cuantificar la proteína es imprescindible que la muestra no lleve DTT (o beta-mercapto etanol).

ii. Tampón de lisis RIPA (para células en cultivo)

RIPA

50 mM Tris-HCl pH 7.5

150 mM NaCl

0.1% SDS

1% NP-40

0.5% Desoxicolato sódico

Añadimos justo antes de usar el tampón los inhibidores de proteasas PMSF (1 mM); benzamidina (2 µg/ml); leupeptina (2 µg/ml); aprotinina (2 µg/ml); EDTA pH 8.0 (1 mM).

Se crecen placas de cultivo hasta un 80-90% de confluencia. Siempre sobre un baño de hielo, las placas son lavadas varias veces con PBS 1X frío. Una vez eliminado bien todo el PBS con una pipeta Pasteur, se añade el tampón de lisis ya con los inhibidores de proteasas (200 µl para una placa de 16 cm de diámetro). Se rasca y se añade a un tubo frío. Añadimos 50 µl más de tampón para recuperar los restos celulares que queden en la placa. Se dan varios pulsos con el vórtex y se deja rotando durante 15 minutos a 4°C o 30 minutos en hielo. Manteniendo el tubo en hielo se pasa el lisado a través de una jeringa de insulina 5-8 veces. El lisado se centrifuga 10 minutos a 1300 rpm a 4°C. Se recupera el sobrenadante. Una vez realizada la determinación de la concentración de proteínas del lisado, se hacen alícuotas (50 o 100 µg) en tampón de carga Laemmli (LB) sin DTT o beta-mercaptoetanol. Antes de cargar en el gel se añade el DTT o beta-mercaptoetanol y se incuba 5 minutos a 90°C.

XII.1.b Extracción proteica de fracciones celulares

i. Extracción de la fracción proteica soluble de muestras de tejido

Tampón T5

50 mM Tris pH 7.5

1% Tritón X-100

Justo antes de su utilización se añaden al tampón los inhibidores de proteasas: 1 mM NaOVA; 1 mM PMSF; 10 µg/ml leupeptina y aprotinina; 1 µg/ml pepstatina .

La muestra es pulverizada en nitrógeno líquido o directamente triturada en el tampón de lisis T5 con un homogenizador. Se incuba \geq 15 minutos rotando a 4°C. Finalmente, se centrifuga a 4°C, 10 minutos a 13000 rpm y se recupera el sobrenadante.

Para recuperar la fracción insoluble, el botón es lavado con el mismo tampón T5 para eliminar restos de la fracción soluble.

ii. Extracción proteica de la fracción insoluble (proteínas de membrana y asociadas al citoesqueleto)

Tampón RIPA para tejido

150 mM NaCl

50 mM Tris-HCl pH 7.5
 1% desoxicolato
 0.1% SDS
 1% Triton X-100

Antes de su utilización añadimos al tampón los inhibidores de proteasas: 10 µg/ml leupeptina y aprotinina; 1 mM PMSF. Se repite el proceso anterior y se recupera el sobrenadante. El botón restante puede tratarse finalmente con tampón de carga Laemmli (2% SDS) hirviendo 10 minutos para recuperar proteínas nucleares.

XII.2 Preparación del gel y transferencia

Gel de poliacrilamida al 8 % (Tris-glycine SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Gel de separación (8 %): Para un volumen final de 15 ml: 6.9 ml agua miliQ; 4 ml de acrilamida 30 %; 3.8 ml de Tris 1.5 M (pH 8.8) ; 150 µl SDS 10%; 150 µl APS 10% (Persulfato de amonio); 6 µl TEMED.

Gel de acumulación (5 %): Para un volumen final de 5 ml: 3.4 ml agua miliQ; 830 µl de acrilamida al 30%; 630 µl Tris 1M (pH 6.8); 50 µl SDS 10%; 50 µl APS 10%; 5 µl TEMED.

Tampón de electroforesis: 25 mM Tris, 250 mM Glicina pH 8.3, 0.1% SDS

Cargamos 50-100 µg de proteína con el correspondiente tampón de carga (Laemmli) y 100 mM DTT. La electroforesis se lleva a cabo a 90V durante 2 horas.

Transferencia a una membrana de nitrocelulosa (BioRad):

Tampón de transferencia: 39 mM Glicina, 48 mM Tris base, 0.037% SDS, 20% metanol

Se lavan las placas con agua destilada y se secan. Se cortan 4 piezas de Whatman 3MM y 1 de nitrocelulosa de la medida exacta del gel. Se hidrata la membrana de nitrocelulosa en agua desionizada durante 5 minutos. Las 4 piezas de Whatman y las dos esponjas se humedecen con tampón de transferencia y se realiza el montaje. El gel y la membrana se disponen entre los dos papeles whatman, el gel en el ánodo (las proteínas están cargadas negativamente) y la membrana en el cátodo. La transferencia se realiza durante la noche, a 4°C, entre 15-20 V. Es importante aunque no imprescindible, mantener en agitación el tampón de transferencia durante todo el proceso.

Una vez realizada la transferencia, la membrana es teñida con Rojo Ponceau (0.5% Ponceau, 1% ácido acético glacial en agua miliQ) durante 5 minutos y lavada 2 minutos en agua miliQ. De esta manera se determina si la transferencia ha sido completa y correcta y si la cantidad de proteínas cargadas en cada carril es equivalente. Previo a la incubación con el

anticuerpo primario, la membrana es bloqueada en una solución 5% leche en polvo en PBS 1X, Tween-20 0.1% durante 1 hora a temperatura ambiente. La dilución de anticuerpo primario utilizada es de 1:1000 si se trata del suero inmune del conejo (o de 2 a 5 µg/ml si se trata del anticuerpo purificado o la indicada por la casa comercial), en PBS 1X-Tween-20 0.1%, 2% leche en polvo. Se incuba durante 1 hora en agitación, a temperatura ambiente. A continuación la membrana es lavada con PBS-T en abundancia durante 30 minutos (3 lavados de 10 minutos) en agitación. Una vez lavada se incuba con el anticuerpo secundario acoplado a HRP a una dilución 1:2000, 1 hora en agitación. Tras lavar como en el paso anterior, la membrana se pone en contacto con el sustrato ECLTM (Amersham Pharmacia Biotech). La membrana se expone sobre un film y se revela (30 segundos – 5 minutos de exposición).

XII. 3 Desondado de la membrana del western

Tampón de desondado

62.5 mM Tris HCl (pH 6.7)

2% SDS

100 mM beta-mercaptoetanol (añadir en el momento)

Calentar la solución en un baño a 50°C y añadir el beta-mercaptoetanol (en campana). Tapar el recipiente que ya contiene la membrana e incubar durante 30 minutos en una estufa a 50°C con agitador. Lavar varias veces en un volumen abundante de PBS-Tween 0.1% durante 30 minutos o más (se han de eliminar completamente los restos de beta-mercaptoetanol ya que podrían interferir en la incubación posterior con el anticuerpo primario). Para comprobar que el proceso ha sido correcta, se bloquea la membrana y se incuba con el anticuerpo secundario tal como se describe arriba. El tiempo de exposición de la membrana se aumenta hasta 15 minutos para comprobar que verdaderamente no obtenemos señal alguna.

XIII. INMUNOHISTOQUÍMICA (DAKO)

Hemos realizado esta técnica sobre muestras parafinadas. Los cortes de microtomo (5 µm) tienen que ser desparafinados. Para ello, los portas con las muestras son incubados durante 1 hora en estufa a 60°C y sometidos a un lavado en xilol (3 X 5 minutos). A continuación, las muestras son hidratadas en una batería de etanoles (98, 96, 70 %) x 2 durante 3 minutos cada uno. Una vez hidratadas y lavadas en agua, se procede a la exposición de los antígenos, para ello, son hervidas en tampón citrato pH 6.0 a una dilución 1:10 durante 2 minutos 30 segundos.

Se deja atemperar durante 10 minutos y se lavan con agua y PBS 1X.. El bloqueo de la actividad peroxidasa endógena se realiza con peróxido de hidrógeno al 3 % durante 7 minutos. A continuación se lava con agua y PBS 1X y se incuba con el anticuerpo primario (suero preinmune 1:1000; anticuerpo purificado 2-5 µg/ml) durante 30 minutos a TEMPERATURA ambiente. La dilución se realiza en un tampón de la misma casa comercial que ya lleva agentes bloqueantes. Se lava con PBS 1X (3 lavados de 5 minutos cada uno) y se incuba con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (policlonal) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar con PBS 1X se añade el sustrato diaminobenzamidina (DAB). Contrateñimos con hematoxilina diluida.

XIV. INMUNOCITOQUÍMICA (con fluorescencia)

Puede realizarse sobre cubres o sobre portas tratados con Poly (L) Lysina y gelatina (delimitando los pocillos previamente).

Preparación del cultivo celular. Se siembran 10.000-50.000 células por pocillo. Al día siguiente se realizan 3 lavados de 3 minutos cada uno sobre baño de hielo con PBS frío. Fijamos con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos (en hielo). Lavamos 2 x con PBS (3 minutos) e incubamos media hora con NH₄Cl 50 mM (su función es unirse a los grupos amino del formaldehído y reducir su autofluorescencia). La muestra celular es permeabilizada con una solución de Saponina al 0.1% y BSA al 1% en PBS, durante 30 minutos. Se vuelve a lavar con PBS y se incuba con el anticuerpo primario durante 2 horas (suero inmune diluido 1:1000 en la solución de permeabilización; anticuerpo purificado 2 µg/ml; 2-10 µg/ml según anticuerpo comercial). Transcurrido este período, se vuelve a lavar con PBS y se incuba con el anticuerpo secundario durante 1 hora (anticuerpo anti-Ig de conejo conjugado a rodamina o TRITC; anticuerpo anti-Ig de ratón a FITC). Finalmente, la muestra se lava con PBS y se monta con medio de montaje para fluorescencia (Immuno Floure Mounting Medium, ICN Biomedicals). Se guarda a 4°C protegido de la luz.

Inmunocolocalización: el análisis de colocación de dos proteínas se ha realizado mediante inmunocitoquímica. El proceso seguido es el ya explicado anteriormente con la diferencia de que incubamos al mismo tiempo dos anticuerpos primarios y dos secundarios. Se ha podido realizar así porque en todos los casos los anticuerpos primarios provienen de especies distintas. Como precaución, para evitar el posible ruido de fondo, añadimos a la solución del bloqueo (que es la misma solución en la que se diluye el anticuerpo secundario) suero de cabra siempre y cuando alguno de los primarios que utilizemos sea de cabra.

XV. TRANSFECCIÓN TRANSITORIA

Para realizar este proceso se utilizó lipofectamina (Life Technologies). Esta lipofectamina viene acompañada de un reactivo, *PLUS reagent*, que forma complejos con el DNA aumentando la eficiencia de unión de este DNA a la lipofectamina. El proceso a seguir es el siguiente:

El día previo a la transfección, se siembran las células y se dejan crecer en medio sin antibiótico. Cuando las células han alcanzado entre un 50-80 % de confluencia, sustituimos el medio de cultivo por medio sin suero y sin antibiótico. El DNA se diluye en medio sin suero y se le añade *Plus reagent*, mezclamos y dejamos incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Transcurrido este periodo, el DNA se mezcla con la lipofectamina ya diluida en medio sin suero y se incuba otros 15 minutos. El complejo es añadido a las células. Transcurridas 5 horas, el medio de las células es cambiado por medio de cultivos con 10 % de suero (se puede sustituir completamente el medio o añadirle el mismo volumen de medio al 20 % de suero). Las células se procesan entre 24 y 48 horas después de la transfección.

Dependiendo del tipo de experimento para el que se realiza la transfección, obtención de proteína para western o análisis de la localización celular de la proteína, las células se cultivarán en placas de cultivo (6-10 cm) o en cubreobjetos circulares depositados en placas de cultivo de 6 pocillos. En este último caso, transcurrida la transfección, los cubreobjetos se lavan con PBS 1X tres veces y se fijan con paraformaldehído al 4% durante 15 min en la oscuridad. Si la proteína transfectada es de fusión con GFP (green fluorescent protein), los cubres se disponen sobre portas con medio de montaje (Immuno Fluore Mounting Medium, ICN) y se visualizan directamente con el microscopio confocal. En el resto de casos, se procede a realizar una inmunocitoquímica.

XVI. AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS INSOLUBLES EN TRITÓN DE BAJA DENSIDAD

XVI.1 Mediante gradiente de sacarosa

El protocolo utilizado es una modificación del descrito en 1992 por Brown and Rose (Brown y Rose, 1992; Sargiacomo, 1993).

La línea celular utilizada es PC3. Se parte del crecimiento de 3 placas de 15 cm de diámetro (6×10^7 células). Tras lavar con PBS 1X, las células se rascan con 2 ml de medio salino MBS (Mes Tampóned Saline); 25 mM Mes pH 6.5, 0.15 M NaCl, 1% Tritón X-100, 1 mM PMSF. El producto es lisado con un homogenizador (alrededor de 30 segundos, evitando formar

espuma). A continuación realizamos un gradiente de sacarosa. La muestra es llevada a 40% de sacarosa y se deposita en un tubo de polialómero (Beckman, volumen 13.5 ml). Sobre esta creamos el gradiente discontinuo de sacarosa que se realiza con la misma solución salina pero sin Tritón ni PMSF y que consta de las concentraciones de sacarosa al 30%, 20%, 10%, 5%. El gradiente se centrifuga a 39000 rpm durante 16-22 horas a 5°C en un rotor basculante SW41 (Beckman). Una vez finalizada la centrifugación, se recuperan las distintas fases y se diluyen con tampón MBS sin tritón. Una dilución 1:6 ya es suficiente. La fase de 40% se dializa contra la solución MBS con tritón sin sacarosa. El resto de fracciones se vuelven a centrifugar a 39000 rpm. El botón es resuspendido en tampón Laemmli 1X (50 µl). Una tercera parte se somete a electroforesis en gel de poliacrilamida.

XVI.2 Mediante gradiente de densidad utilizando *OPTIPREP*. Ensayo de inducción de la línea PC3 con IGF-1* (Manes y cols, 1999).

El fundamento de la técnica es semejante al proceso descrito en el apartado anterior. Se trata de una separación de las fracciones proteicas celulares mediante gradiente de densidad pero esta vez, en lugar de sacarosa, se utiliza Optiprep (iodixanol) que es un medio de gradiente de densidad no iónico (Nycomed Pharma, Oslo, Norway).

El proceso se inicia con la siembra de aproximadamente 1.6 millones de célula por placa de 6 cm de diámetro. Se incuba en medio completo durante 10-12 horas. Transcurrido este tiempo, el medio es cambiado por medio sin suero en el que se mantienen durante 3 horas. A continuación se procede a inducir con IGF-1 (100 ng/ml en medio RPMI sin suero). En este experimento se ha llevado a cabo la siguiente cinética de inducción: 0 min- 5 min-10 min-15 min y 30 min de inducción con el factor. Transcurrido este tiempo, las células se lavan con PBS 1x a 4°C. El proceso se realiza a 4°C para mantener la estabilidad de los microdominios lipídicos y evitar perderlos durante el proceso. Las placas de células se mantienen en hielo durante 15 min. Seguidamente se rascan con 300 µl de solución TNEX 1x (50 mM Tris-HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0.2% Tritón X-100) con inhibidores de proteasas y se incuban en hielo durante 20 min. Entonces la solución se lleva a una concentración de 35% de Optiprep (a partir de una solución de Optiprep al 52% en TNEX1x). A continuación se forma el gradiente sobre un tubo. Se añaden los 300 µl al 35% de Optiprep seguido de 3.5 ml de Optiprep al 30% y 200 µl de TNEX1x. La muestra es centrifugada a 170 000g durante 4 horas a 4°C, utilizando el rotor SW60 (Beckman). Tras centrifugar, se recuperan 6 alícuotas de aproximadamente 650 µl cada una. Para precipitar la fracción proteica, se añade a cada alícuota un volumen de ácido tricloroacético (TCA). El botón resultante se resuspende en tampón Laemmli y se somete a electroforesis en un gel de acrilamida.

XVII. INMUNOPRECIPITACIÓN

La técnica de inmunoprecipitación se ha realizado partiendo de una transfección transitoria del gen de interés. Mediante esta técnica puede demostrarse la especificidad del anticuerpo generado por su proteína, al mismo tiempo que se comprueba que dicho anticuerpo es óptimo para la realización de posteriores co-inmunoprecipitaciones en las que se demuestre la positividad de las interacciones proteína-proteína encontradas mediante la técnica del doble híbrido.

La transfección se ha realizado con el plásmido GFP-PTOV1. 48 horas tras la transfección, las células son lisadas en el siguiente tampón: 10 mM Tris pH 8.0, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton X-100; pepstatina (1 µg/ml), PMSF (100 µg/ml), aprotinina (10 µg/ml) y leupeptina (10 µg/ml). El lisado se pasa varias veces por jeringa de insulina y se incuba en hielo durante 30 min. Paralelamente, se equilibra el botón correspondiente a 100 µl de Sepharosa (Sepharose CL-4B, Pharmacia) con el mismo tampón de lisis. El sobrenadante del lisado se incuba con la sepharosa durante 1 h a 4°C en agitación. Transcurrido este período se vuelve a centrifugar y el lisado pre-aclarado se divide en dos para incubarlo 12-16 a 4°C con el anticuerpo problema y con otro anticuerpo generado en la misma especie que nos servirá de control. Debido a que el anticuerpo utilizado es de conejo, la proteína recombinante que se ha utilizado es la proteína A-agarosa. Previo a su utilización, la proteína A tiene que equilibrarse en el tampón de lisis. Incubamos el inmunocomplejo durante 1 h a 4°C en agitación. Centrifugamos y el botón se lava varias veces con el tampón de lisis, la última vez sin detergente. Finalizados los lavados, el botón se resuspende en tampón Laemli 1X más DTT. En este caso la proteína que tendría que capturar el anticuerpo es la proteína de fusión GFP-PTOV1. Podemos detectarla utilizando el anticuerpo monoclonal anti-GFP y de esta manera no obtenemos el fondo de inmunoglobulinas que obtendríamos si utilizásemos el anticuerpo policlonal anti-PTOV1. Como control se ha inmunoprecipitado con otro anticuerpo que no reconoce esta proteína de fusión y por tanto, el Western blotting con el anticuerpo anti-GFP sirve de control negativo.

XVIII. TÉCNICA DEL DOBLE HÍBRIDO (YEAST TWO HYBRID)

XVIII. 1 Fundamento del sistema del doble híbrido

Con el fin de conocer la función o implicación de la proteína en las diversas vías celulares, se ha llevado a cabo la técnica del doble híbrido. Dicha técnica permite detectar in

La cepa utilizada en este estudio, AH109, incluye los marcadores ADE2, HIS3 y lacZ. Estos se encuentran bajo el control de los promotores GAL2, GAL1 y MEL1, respectivamente. Todos estos promotores responden específicamente al factor transcripcional GAL4.



Figura 22. La cepa AH109 contiene tres promotores en los que se encuentra la secuencia de reconocimiento y activación UAS. Una vez GAL4 active estas secuencias, la cepa producirá adenina, histidina y será capaz de hidrolizar el anillo beta-lactámico de α -XGal de manera que cambiará el color de las colonias a azul. Estos tres marcadores reducen el número de falsos positivos.

El vector portador del BD codifica también para la sintasa del aminoácido triptófano, Trp. El portador del AD codifica para leucina. La síntesis de estos dos aminoácidos permitirá que la colonia co-transformada pueda crecer en medio sin leucina ni triptófano. Finalmente, cuando el crecimiento se realice en medio -Leu/-Trp/-His/-Ad, sabremos que las colonias que crezcan serán portadoras de dominios que interaccionan entre sí. Para corroborar que no se tratan de falsos positivos, las colonias son sembradas en el mismo medio pero esta vez con α -XGal. Las colonias azules serán las positivas. El responsable del color es lacZ. Aun así pueden obtenerse falsos positivos.

A la hora de llevar a cabo la técnica, paralelamente al rastreo de la librería se han de realizar una serie de controles para comprobar la eficiencia de transformación / co-transformación y que el proceso se ha realizado correctamente. Como control positivo se ha utilizado pBDp53, que interacciona específicamente con pADSV4. Como control negativo se ha utilizado pBD laminina C / pADSV40 (no interaccionan). La eficiencia de transformación se calcula mediante el recuento de colonias que crecen en placas SD -Leu (pAD); SD -Trp (pBD); SD -Leu/-Trp (co-transformación de pBD X pAD). Mediante el recuento de las colonias co-transfectadas, sabremos el número de clones de la librería que han sido testados y si necesitamos realizar otra hibridación o no. Se han de comprobar un total de 6×10^6 clones.

XVII. 2 Células competentes

El proceso se inicia con la preparación de células competentes. Para ello se seleccionan varias colonias de unos 3 mm de diámetro y se dispersan en 1 ml de medio YPD mediante vórtex. Este volumen se transfiere a 150 ml de medio YPD y se incuba a 30°C, 250 rpm durante 18 horas

hasta alcanzar una OD₆₀₀ superior a 1.5. Una vez alcanzado, el volumen se transfiere a 1 L de YPD para obtener una OD₆₀₀ de 0.2-0.3. Se vuelve a incubar durante 3 horas hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.5. El cultivo se centrifuga 5 min a 1.000x g en tubos de 50 ml y el botón se resuspende en 500 ml de H₂O estéril o TE. Se vuelve a centrifugar y esta vez el botón se resuspende en 8 ml de 1X TE/LiAc.

XVII.3 Transformación de levaduras

Una vez obtenemos las células se procede a su transformación. La cantidad de BD y librería utilizadas depende de la eficiencia de co-transformación obtenida en los ensayos previos a pequeña escala.

- 200 µg- 1 mg DNA-BD vector
- 100 µg – 500 µg AD vector (librería)
- 20 mg DNA arenque (carrier)
- 8 ml células competentes
- 60 ml PEG (40%) / LiAc (1X) fresco.

Antes de añadir PEG/LiAc, el resto de los componentes se mezcla bien con vórtex. Tras añadirlo, se incuba a 200 rpm durante 30 min a 30°C. Se añade 7 ml de DMSO y se mezcla por inversión. Entonces se procede al choque térmico que consiste en una incubación durante 15 min a 42°C seguida de una de 2 min en hielo. Las células se centrifugan a temperatura ambiente 1000xg, 5 min y el botón se resuspende en 10 ml de 1XTE estéril. Por cada placa de 15 cm de diámetro se siembran 200 -250 µl de células co-transformadas (100 µl si se ha transformado con un sólo plásmido). Los controles positivos y negativos se realizan en placas de 10 cm de diámetro y las cantidades utilizadas varían (son del orden de 10 veces menos)

XVIII.4 Selección de los positivos

Las células transfectadas son sembradas en placas -Leu / -Trp y -Leu / -Trp / -His / -Ad. El tiempo de incubación a 30°C hasta que aparezcan los primeros positivos es relativo, normalmente de 1 semana. Si la cotransfección ha ido bien, las colonias de levadura crecen sin problemas en las placas -Leu / -Trp. Si existe interacción entre ambos plásmidos entonces GAL4 activa los operones ADE2, HIS3 y LacZ, y las células son capaces de crecer en medio sin histidina ni adenina. El hecho de tener tres marcadores de selección reduce la posibilidad de falsos positivos. Una vez tenemos las primeras colonias, las seleccionamos y sembramos en una placa SD-Leu/-Trp/-His/-Ad con α -Xgal. Si el color de la nueva colonia que crece es azul, sabremos que existe interacción entre las proteínas y, probablemente nos encontremos ante un

positivo. Este proceso se repite un total de tres veces, siempre en placas SD-Leu/-Trp/-His/-Ad + α -Xgal y siempre seleccionando una colonia azul que es la que se vuelve a sembrar. Estas repeticiones sucesivas podrían no realizarse pero es recomendable porque, además de comprobar que verdaderamente son azules, lo que conseguimos así es eliminar los posibles plásmidos que, pese a que no interaccionan con nuestra proteína, han sido arrastrados a costa del (con mayor probabilidad) verdadero positivo. No hay que olvidar que el número de plásmidos cotransfectados por cada célula de levadura es variable.

XVIII.5 Aislamiento de la colonia positiva

Las colonias positivas se hacen crecer en medio líquido -Leu/-Trp/-His, y de esta manera enriquecemos las células portadoras de pAD que interaccionan con el cebo. Se extrae el DNA plasmídico y se comprueba mediante PCR con cebadores específicos para pAD. La información que obtenemos a partir de esta PCR es, por un lado, si existe más de un plásmido y por otro, el tamaño aproximado del inserto o insertos. Si existe más de una colonia con plásmidos positivos con el mismo tamaño de inserto, puede realizarse una digestión enzimática para comprobar si se trata del mismo plásmido o si es otro positivo distinto de igual tamaño de inserto.

A continuación se procede a realizar una transformación del extracto plasmídico de la levadura en bacterias con el fin de aislar el o los plásmidos portadores de la proteína de interacción. (*ver apartado de Transformación por electroporación*). Para ello, previamente se ha llevado a cabo la extracción del DNA plasmídico de la levadura. En nuestro caso, tanto el pAD como el pBD confieren resistencia al mismo antibiótico (Amp), por lo que la selección del positivo de interacción se complica porque el número total de colonias bacterianas obtenidas pueden contener tanto uno como el otro. La comprobación se realiza mediante PCR con los primers específicos para el pAD. Una vez aislados, se comprueba que verdaderamente existe interacción del plásmido de librería con nuestra proteína mediante una nueva co-transformación. (pBDgen problema X pAD positivo de la librería). En esta última comprobación realizamos en paralelo otra cotransformación: pBD X pAD positivo de la librería. De esta manera comprobamos que la interacción se debe a nuestro gen y no a que el positivo interaccione con el pBD. Si el ensayo es positivo, procederemos a secuenciar el plásmido para analizar su inserto.

Los cebadores del pACT2 utilizados, tanto para amplificar el inserto como para secuenciarlo son los siguientes:

PACT2 forward: 5'-GAAGGCAAACGATGATATAAATG-3' (Tm 64°C)

PACT2 reverse: 5'-CGATGATGAAGATACCCAC-3' (Tm 60°C)

(Kit utilizado: MATCHMAKER Two-Hybrid System, Clontech, Palo Alto, CA)

XVIII.6 Extracción de DNA plasmídico de levaduras

La extracción se realiza a partir del crecimiento de la colonia portadora del plásmido de interés en medio líquido. En nuestro caso, al tratarse del plásmido pACT2- cDNA librería de próstata, el medio de crecimiento fue (20-50 ml) SD -Leu, -Trp, -His +Ad. Se incuba durante 20-40 horas a 30°C, 200 rpm. Se centrifuga y el botón es resuspendido en 200 µl de YLS (yeast lysis solution: 2% Tritón X-100, 1% SDS, 10mM Tris-HCl (pH8.0), 100 mM NaCl, 1mM EDTA). Se añaden 200 µl de phenol- cloroformo isoamílico más 0.3 gr de glass beads (SIGMA).

Agitamos en vórtex durante 2 min. A continuación se centrifuga la muestra y se procede a la precipitación del DNA. Añadimos 1:10 de NaoAc 3M (pH 5.2) y 2,5 volúmenes de ETOH absoluto. Se centrifuga y el botón se lava con ETOH 70%. El botón resultante del lavado se resuspende en 50 µl de TE agua destilada.