



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 343 950**

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03763885 .5**

96 Fecha de presentación : **17.07.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1530724**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.05.2005**

54 Título: **Diagnóstico y prevención de la invasión de células cancerosas.**

30 Prioridad: **17.07.2002 EP 02015944**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.08.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.08.2010

73 Titular/es: **Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung
der Wissenschaften e.V.
Hofgartenstrasse 8
80539 München, DE**

72 Inventor/es: **Ullrich, Axel;
Knyazev, PJotr;
Knyazeva, Tatjana;
Cheburkin, Yuri y
Vajkoczy, Peter**

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 343 950 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico y prevención de la invasión de células cancerosas.

5 La presente invención se refiere a un método *in vitro* para determinar la capacidad de invasión del cáncer, que comprende medir en una muestra que comprende células cancerosas la expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en AXL y GAS6, en el que una expresión elevada se correlaciona con una elevada capacidad de invasión.

10 En años recientes se ha demostrado que la sobreexpresión de tirosina cinasas receptoras (RTK) está en muchos casos asociada con el desarrollo de trastornos malignos, particularmente cáncer en mamíferos, incluyendo seres humanos. Por ejemplo, la sobreexpresión de la tirosina cinasa receptora AXUUF0 (ref. 1, 2: número de acceso Genbank M 76125) se ha implicado en el desarrollo de tumores hematológicos humanos. Además, datos muy recientes indican que la señalización de AXL y su ligando GAS6 está implicada en angiogénesis, adhesión y supervivencia de células
15 cancerosas (ref. 3, 4, 5, 6, 7, 8). En Breast Cancer Research and Treatment (Oct. 1997), vol. 46, n° 1, p. 91, Attar, E.C. *et al.*, describen estudios sobre la expresión de la tirosina cinasa receptora de AXL en cáncer de mama humano (ref. 33). Dodge Zantek N. *et al.* han presentado MCF-10A NeoST como un nuevo sistema celular para estudiar las interacciones célula-ECM y célula-célula en cáncer de mama (ref. 34). Estos autores sugieren un papel potencial de AXL en la invasividad y como factor progresivo para el cáncer de mama. Sin embargo, no se han presentado datos que
20 demostrasen que la sobreexpresión de AXL está relacionada con la capacidad de invasión y/o formación de metástasis en otros trastornos malignos.

Domagala (American Journal of Pathology, vol. 136, n° 1, 1990, páginas 219-228), Bachmeier *et al.* (Anticancer Research, vol. 21, n° 6A noviembre 2001, páginas 3821-3828) y el documento WO 92117608 describen métodos para
25 determinar la capacidad de invasión de células cancerosas con la ayuda de proteínas marcadoras.

Zantek *et al.* (Clinical Cancer Research, 7/11, 3640-3648) describe el aislamiento y caracterización de dos variantes de una estirpe de células epiteliales de mama normal.

30 Attar *et al.* (Breast cancer research and treatment, octubre 1997, vol. 46, n° 1 p. 91) muestran un anticuerpo policlonal anti-AXL frente al dominio N-terminal de AXL.

Meric *et al.* (Clinical Cancer Research, 8/2, 361-367) describe el perfil de expresión de tirosina cinasas en cáncer de mama.

35 El documento US-A-5.468.634 describe secuencias de ADN aisladas que codifican el receptor de AXL oncogénico, así como un anticuerpo anti-AXL.

La presente invención se define por las reivindicaciones anejas.

40 Un objetivo del presente estudio fue establecer perfiles de expresión de genes particularmente seleccionados de proteína cinasas, fosfatasas y otros genes de señalización en trastornos malignos, particularmente cáncer de mama y cáncer de cerebro, a fin de identificar nuevos marcadores para determinar la capacidad de invasión y/o capacidad de agresión. Se usó un chip de hibridación de ADNc para analizar los perfiles de la expresión génica de siete estirpes de células de cáncer de mama muy invasivas, catorce estirpes de células de cáncer de mama débilmente invasivas y
45 tres estirpes de células epiteliales de mama normales. Se identificaron las diferencias en la expresión génica entre las estirpes de células de cáncer de mama débil y muy invasivas, lo que permitió la definición de una agrupación génica que se correlaciona con la capacidad de invasión de una estirpe celular de cáncer de mama. Usando esta agrupación o combinaciones de genes de ella, es posible una discriminación de estirpes celulares de cáncer de mama muy invasivas de las estirpes celulares de cáncer de mama débilmente invasivas y de las estirpes celulares epiteliales de mama
50 normales.

Además, en un intento para identificar nuevas tirosina cinasas receptoras (RTK) implicadas en la biología de glioma maligno, se ha determinado el perfil de expresión de RTK en estirpes celulares de glioma humano mediante una técnica de microchip de ADNc. Además de EGFR y PDGFR- α , el receptor UFO/AXL fue una de las RTK expresadas de forma
55 más destacada. En 7 de 9 estirpes celulares de glioma humano ensayadas, el ARNm de UFO/AXL tuvo un nivel de expresión mayor que el ARNm para EGFR (Tabla 4). La inhibición de la transducción de la señal de UFO/AXL sobreexpresando una forma mutante negativo-dominante, truncada, de UFO/AXL suprimió la progresión tumoral y prolongó la supervivencia en ratones cuando se comparó con células que sobreexpresan la forma de tipo natural de UFO/AXL. A fin de estudiar el mecanismo de señalización de UFO/AXL y su papel en el crecimiento de gliomas, se
60 evaluó *in vitro* la morfología de las células tumorales y el comportamiento de las células tumorales con respecto a la proliferación, capacidad de agregación, migración, e invasión. Además, se analizó *in vivo* el comportamiento de células tumorales, la angiogénesis tumoral, y la perfusión tumoral mediante microscopía de multifuorescencia intravital. El estudio indica un nuevo papel para UFO/AXL, es decir, en la mediación de las interacciones célula/célula del glioma, la migración de células de glioma y la invasión del glioma. UFO/AXL es la primera RTK a ser implementada en la
65 mediación del crecimiento metastásico local, infiltrante difuso, de tumores de cerebro malignos.

De este modo, se describe un método para determinar la capacidad de invasión de trastornos malignos que comprende determinar la expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en AXL (Genbank M 76125), GAS 6 (Genbank L 13720), MMP14 (Genbank NM 004995), ADAM12 (Genbank AF 023476), ADAM17 (Genbank U 69611), MT3MMP (Genbank NM 005961), FGF2 (Genbank NM 002006), FGFS (Genbank NM 004464), FYN (Genbank M 14333), LYN (Genbank M 16038), DDR2 (Genbank X 74764), TIMP1 (Genbank NM 003254), HB-EGF (Genbank NM 001945), SGK (Genbank Y 10032), RPS6RB1 (Genbank M 60724), MAP4K4 (Genbank XM 038748), SIRP α (Genbank Y 10375) y Anexina A2 (Genbank D 00017). Además, se puede determinar la expresión de los genes Stat 5b (Acc. NM_012448) o EDG2 (Acc. NM_057159) como indicador para determinar la capacidad de invasión de trastornos malignos, opcionalmente además de determinar la expresión de uno o más de los genes anteriores. Se encontró que una expresión elevada de al menos uno de los genes anteriores se correlaciona con una capacidad elevada de invasión.

Además, dentro de los presentes estudios, se encontró que una capacidad elevada de invasión se correlaciona con una expresión elevada de al menos dos de los genes anteriores, en particular AXL y uno o más genes adicionales. El uno o más genes adicionales se pueden seleccionar de los genes enunciados anteriormente, o de un gen que ya es conocido como marcador para la capacidad de invasión.

De este modo, el método comprende preferiblemente determinar la expresión de varios de los genes anteriores, por ejemplo determinar la expresión de al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho genes. Más preferiblemente, el método comprende determinar la expresión de al menos el gen AXUUF0 (Genbank M 76125). Además, el método puede comprender determinar la expresión de al menos un gen adicional que ya se conoce como marcador de la capacidad de invasión, tal como CD44 (Genbank X 66733), vimentina (Genbank X 56134), CAV1 (Genbank Z 18951), CAV2 (Genbank AF 03572), MMP 1 (Genbank M 13509), MMP 2 (Genbank NM 004530), MMP9 (Genbank NM 004994), M-CSF (Genbank M 37435) y EPHA2 (Genbank M 59371).

Se encontró una correlación entre la expresión de la agrupación génica anterior, y particularmente el gen AXL, y la capacidad de invasión en varios tipos de trastornos malignos, por ejemplo cáncer de mama, particularmente cáncer de mama primario, cáncer de próstata, cáncer de riñón y glioblastomas u otros cánceres de origen epitelial. De particular interés es el hallazgo de que existe una correlación entre la expresión de uno o más de los genes marcadores anteriores, y en particular del gen AXL, y la capacidad de invasión de glioblastomas.

Además, se encontró que la sobreexpresión estable de un mutante negativo-dominante del gen AXL es capaz de suprimir fuertemente la capacidad de invasión y la migración celulares, indicando que la inhibición de la función de AXL puede bloquear y perder la formación de metástasis en trastornos malignos muy invasivos, tales como cáncer de mama o cáncer de cerebro, por ejemplo glioblastoma. Adicionalmente, un anticuerpo policlonal dirigido contra la porción extracelular de AXL tiene una actividad inhibidora muy potente sobre la migración y capacidad de invasión de células cancerosas, por ejemplo estirpes celulares de cáncer de mama o de próstata. Además, la sobreexpresión de AXL de tipo natural en estirpes celulares de cáncer de mama o de cáncer de próstata débilmente invasivas y células de glioma incrementó significativamente su capacidad de invasión.

Estos datos demuestran que el gen y la proteína de AXL es una nueva diana prometedora para la prevención o tratamiento de trastornos malignos, particularmente para inhibir la capacidad de invasión y/o formación de metástasis tumoral en trastornos malignos.

De este modo, se describe un método para reducir la capacidad de invasión de trastornos malignos, que comprende inhibir el gen AXL, el gen o proteína ligando de AXL, o su ligando. El método puede comprender (i) inhibir la actividad de tirosina cinasa receptora de la proteína AXL, (ii) inhibir la expresión del gen AXL, (iii) inhibir la interacción entre la proteína AXL y sus ligandos, particularmente GAS6, y/o (iv) inhibir la interacción de AXL con factores de transducción de señales aguas abajo.

Con respecto a los ligandos de la proteína AXL, se ha encontrado en particular que los dominios similares a laminina G de GAS6 (GAS6-LG) están implicados en la interacción con la proteína AXL, tal como la unión y activación de AXL (Referencia 36). En particular, los restos del dominio de GAS6-LG2, por ejemplo Leu⁶²⁰, Tyr⁶⁶⁰ y Phe⁴⁸⁷, afectan a la unión y/o activación de AXL. El método para reducir la capacidad de invasión de trastornos malignos puede comprender la inhibición de uno o más restos del GAS6-LG, en particular Leu⁶²⁰, Tyr⁶⁶⁰ y Phe⁴⁸⁷.

Se describe el diagnóstico o la prevención y/o tratamiento de trastornos malignos, particularmente la capacidad de invasión tumoral y/o la formación de metástasis en trastornos malignos. Los ejemplos preferidos de trastornos malignos son cánceres de la mama, próstata, riñón, colon, pulmón, y glioblastomas. Más preferiblemente, el trastorno maligno es cáncer de mama o glioblastomas.

En la realización de diagnóstico de la presente invención, la expresión de los genes asociados con la capacidad de invasión se determina cualitativa y/o cuantitativamente.

La expresión se determina en una muestra que comprende células tumorales, por ejemplo procedentes de un paciente con un tumor humano. La muestra puede derivar de secciones tisulares, muestras de biopsias, etc., o de fluidos corporales. La expresión génica en la muestra a ensayar se puede comparar con la expresión génica en muestras de control, por ejemplo muestras de control negativo procedentes de células "normales" o células malignas débilmente invasivas, y/o procedentes de controles positivos, por ejemplo a partir de células malignas muy invasivas.

La expresión génica se puede determinar según métodos conocidos en la técnica, por ejemplo a nivel del ARNm o del transcrito, y/o a nivel proteico. La medida de la expresión génica a nivel de ARNm puede comprender reacciones de transcripción inversa y/o de amplificación tales como PCR. Preferiblemente, la expresión génica se mide en un chip de ácidos nucleicos, en el que los ácidos nucleicos procedentes de la muestra a ensayar, por ejemplo ARN o ADNc, se hibridan a un chip de sondas inmovilizadas específicas para los ácidos nucleicos a ensayar. En el documento PCT/EP 02/01073 se describe un ejemplo preferido de un chip de ácidos nucleicos adecuado. Como alternativa, la expresión génica se puede determinar mediante otros métodos, por ejemplo hibridación mediante transferencia Northern.

La expresión génica a nivel proteico se puede determinar mediante métodos inmunológicos usando anticuerpos dirigidos contra las proteínas codificadas por genes asociados con la capacidad de invasión. Los anticuerpos se pueden marcar directa o indirectamente mediante grupos marcadores conocidos tales como grupos radioactivos, fluorescentes, quimioluminiscentes o enzimáticos, tales como se conocen en la técnica.

También se describe un método que comprende la administración de un inhibidor del gen AXL, del gen del ligando AXL, de la proteína AXL o su ligando, en una cantidad que es eficaz para reducir la capacidad de invasión de trastornos malignos a un sujeto que lo necesite. El sujeto es preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano. El ligando de la proteína AXL es preferiblemente GAS6, en particular restos de GAS6-LG, como se define anteriormente.

El inhibidor del gen AXL, del gen del ligando AXL, de la proteína AXL o su ligando, por ejemplo GAS6, puede ser un anticuerpo, un ácido nucleico biológicamente activo o un compuesto de bajo peso molecular, por ejemplo un péptido o un compuesto orgánico no peptídico.

El inhibidor puede ser un anticuerpo dirigido contra la proteína AXL o un ligando de la misma, por ejemplo GAS6. El término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales, particularmente a anticuerpos quiméricos o humanizados monoclonales, o a anticuerpos humanos. Además, el término comprende fragmentos de anticuerpos, por ejemplo fragmentos proteolíticos tales como los fragmentos Fab, Fab' o F(ab)₂, o fragmentos recombinantes tales como fragmentos de anticuerpos monocatenarios, por ejemplo fragmentos de scFv. Los métodos para fabricar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos como se describen anteriormente son conocidos en la técnica.

El inhibidor puede ser un ácido nucleico biológicamente activo, por ejemplo un ADN, un ARN o un análogo de ácido nucleico sintético. Los ejemplos preferidos de ácidos nucleicos biológicamente activos son ácidos nucleicos antisentido, ribozimas o moléculas de ARN de interferencia dirigidos contra el gen AXL o un gen del ligando de AXL o un transcrito del mismo. Un ejemplo adicional preferido de un ácido nucleico biológicamente activo es un mutante negativo-dominante del gen AXL. Los ácidos nucleicos biológicamente activos se pueden suministrar mediante procedimientos conocidos, por ejemplo usando vectores de transferencia génica víricos o no víricos.

El inhibidor puede ser un compuesto peptídico, por ejemplo un péptido que tiene una longitud de 4 a 25 aminoácidos, un péptido cíclico, un derivado peptídico o un mimético peptídico derivado de tal péptido. Como alternativa, el inhibidor de bajo peso molecular puede ser un compuesto orgánico no peptídico, por ejemplo un inhibidor de la actividad de cinasa de AXL. Los inhibidores de bajo peso molecular se pueden obtener identificando librerías de compuestos adecuadas en un método como se describe con más detalle más abajo.

Se describe además una composición farmacéutica que comprende como agente activo un inhibidor del gen AXL, un gen del ligando de AXL, una proteína AXL o un ligando de la misma (por ejemplo GAS6, en particular restos de GAS6-LG, como se define anteriormente), junto con diluyentes, vehículos y/o adyuvantes farmacéuticamente activos. Esta composición es particularmente adecuada para reducir la capacidad de invasión de trastornos malignos y/o reducir la formación de metástasis en trastornos malignos. Dependiendo del tipo de inhibidor usado como agente activo, la composición farmacéutica puede ser un líquido, un sólido, por ejemplo un polvo, un comprimido, etc., una emulsión o una suspensión. La composición se puede administrar mediante inyección, oralmente, tópicamente, rectalmente, intranasalmente, o mediante cualquier otro medio adecuado. La cantidad eficaz del agente activo en la composición se puede determinar por la persona experta sin ninguna carga excesiva, dependiendo del tipo de compuesto y de la enfermedad a tratar.

La composición puede comprender al menos un agente activo adicional. Este al menos un agente activo adicional se puede formular junto con el inhibidor de AXL en una sola composición o en una composición separada, que se coadministra con la composición del inhibidor de AXL. El agente activo adicional puede ser un agente citotóxico o citostático, tal como doxorrubicina, cisplatino, carboplatino, un anticuerpo antitumoral, o cualquier combinación de los mismos.

Todavía un aspecto adicional de la invención se refiere a un método para identificar y/o caracterizar un inhibidor de la capacidad de invasión de trastornos malignos, que comprende determinar si al menos un compuesto de ensayo es capaz de inhibir el gen AXL, el gen del ligando de AXL, la proteína AXL o su ligando (por ejemplo GAS6 como se define anteriormente) o proteína. Más particularmente, el método comprende determinar si un compuesto de ensayo es capaz de unirse a la proteína AXL y/o reducir la expresión génica de AXL. El compuesto de ensayo puede derivar de librerías de compuestos, por ejemplo librerías peptídicas o no peptídicas que se someten a identificación en busca de la actividad inhibidora de AXL. El método de identificación puede comprender el uso de un sistema de ensayo a base de células, por ejemplo un sistema que use una célula capaz de sobreexpresar el gen AXL. Adicionalmente o

como alternativa, el método puede comprender el uso de un sistema de ensayo libre de células, en el que el compuesto de ensayo se pone en contacto con proteína AXL sustancialmente purificada, o un fragmento de la misma, a fin de determinar la unión del compuesto de ensayo a la proteína o su fragmento.

Adicionalmente, la invención se explicará con más detalle mediante las siguientes figuras y ejemplos.

Figura 1. *Morfología de estirpes celulares normales y de carcinoma de mama (BC) cuando se cultivan en matriz de Matrigel (crecimiento 3D).*

Las células se cultivaron sobre la parte superior de una capa de Matrigel durante 7-14 días. A, Se muestran fotografías que representan las tres morfologías básicas para las estirpes celulares de BC indicadas. El aumento fue x100 para MDA-MB-231, MDA-MB-435S, BT549 y MCF10A. La determinación de la morfología de las células que se hicieron crecer en Matrigel se llevó a cabo como se describe previamente (10, 11, 12). De forma breve, se colocaron en placas células (5000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos) resuspendidas en 50 μ l de medio de cultivo sobre un revestimiento de Matrigel preestablecido que consiste en 70 μ l de Matrigel (Becton Dickinson) diluido hasta 6 mg/ml en sales de medio basal -RPMA. Tras la polimerización en la parte superior se añadieron 50 μ l de Matrigel (1,0 mg/ml). El crecimiento de la colonia se monitorizó a lo largo del experimento y se fotografió a 7-14 días usando un microscopio Zeiss Axiovert 35 equipado con una cámara digital de OpenLab (UK). Se indica el nombre de la estirpe celular respectiva.

Figura 2. *Clasificación de estirpes celulares de cáncer de mama por el perfil de expresión génica de cinasas y fosfatasa conocidas. Cambios en la expresión génica habituales (agrupamiento AXL) en estirpes celulares de BC débilmente invasivas frente a muy invasivas.*

La expresión génica se midió mediante hibridación en chips de ADNc de ARN (preparaciones por duplicado) procedente de cada una de las estirpes celulares indicadas, como se describe en "Materiales y Métodos". Los 22 genes seleccionados se expresaron diferencialmente en al menos 75% de las estirpes celulares de BC débilmente invasivas, las estirpes celulares de BC muy invasivas (barra roja y verde, subsiguientemente), o ambas, con cambios medios mayores de 2 veces. El nivel de expresión génica con relación a MCF10A se muestra por el color y sombra designados en la clave en la parte inferior del agrupamiento. Cada sombra de color engloba todos los valores en el intervalo abarcado por los números debajo de la escala. También se proporcionan (véanse la Tabla 2 y 3 separadas de genes) los números de acceso de GenBank (véase Tabla 3) y las descripciones para cada gen, así como la localización de las manchas sobre membranas de chips hechos a medida. Se llevaron a cabo estudios de confirmación mediante análisis Northern (AXL y GAS6) o RT-PCR (sistema Roche para la expresión y amplificación de HER2, no mostrado) usando las mismas preparaciones de ARN que en el chip. Excepto que se señale de otro modo, la concordancia entre los chips y otros métodos estaba dentro de 2 veces, correlativa para la mayoría de las muestras. La concordancia cualitativa con el cambio subestimado del chip por otra metodología fue de al menos 10 veces. La posición de estirpes celulares invasivas y débilmente invasivas se indicó mediante barras de color, subsiguientemente.

Figura 3A, B. *Clasificación de cáncer de mama primario y sus estirpes celulares mediante perfil de expresión génica de las cinasas y fosfatasa conocidas.*

La expresión génica se midió mediante hibridación en chips de ADNc de ARN (preparaciones por duplicado) procedente de cada una de las estirpes celulares indicadas y tumores primarios, como se describe en "Materiales y Métodos". Los 26 genes seleccionados se expresaron diferencialmente en al menos 75% de las estirpes celulares de BC débilmente invasivas, las estirpes celulares de BC muy invasivas (barra roja y verde, subsiguientemente), o ambas, con cambios medios mayores de 2 veces. El nivel de expresión génica con relación a tejidos de mama normales (mezcla de dos) se muestra por el color y la forma designados en la clave en la parte inferior del agrupamiento. Cada sombra de color engloba todos los valores en el intervalo abarcado por los números debajo de la escala. También se proporcionan los números de acceso de GenBank (véase la Tabla 3) y las descripciones para cada gen, así como la localización de las manchas sobre membranas de chips hechas a medida. Se llevaron a cabo estudios de confirmación mediante análisis Northern (AXL y GAS6, no mostrados para tumores primarios) o RT-PCR (sistema de Roche sólo para la expresión y amplificación de HER2, no mostrado) usando las mismas preparaciones de ARN usadas en el chip. Excepto que se señale de otro modo, la concordancia entre los chips y otros métodos estaba dentro de 2 veces, correlativa para la mayoría de las muestras; la concordancia cualitativa con el cambio subestimado del chip mediante otra metodología fue al menos 10 veces.

A. Análisis de chips no supervisado de los tejidos de mama normales, tumores primarios, estirpes celulares de cáncer de mama normal. El agrupamiento de AXL incluye 18 genes (la correlación de expresión es 0,51 o significativa), y la mayoría de estos genes se identificó en estirpes celulares de cáncer de mama (véase la Fig. 2).

B. Clasificación de estirpes celulares de tumores primarios y de cáncer de mama usando sólo genes de capacidad de invasión de consenso. Todos los tumores primarios y estirpes celulares de BC se aplicaron para el análisis del agrupamiento usando 26 genes (perteneciente al agrupamiento AXL). Los tumores primarios y las estirpes celulares de BC se reconocieron y las estirpes celulares de BC muy invasivas (HI) pertenecen al mismo árbol (con la excepción de MDA-MB-231 y un tumor primario BC151, indicado por una barra roja).

Figura 4. *Análisis de transferencia Northern de genes AXL/GAS expresados diferencialmente seleccionados.*

ARNm (15 µg/línea) aislado de cada una de las estirpes celulares indicadas se analizó para determinar la expresión de los genes designados mediante hibridación con sondas que corresponden a los fragmentos depositados en los chips de ADNc. Los niveles de expresión para cada ARNm con relación a Ac745 (células epiteliales de mama normales) se registran debajo de cada banda. Los tamaños (a la derecha) que corresponden a las bandas específicas principales están de acuerdo con los dados a conocer en la bibliografía para cada ARNm. Los mismos filtros se usaron, se sondaron y se volvieron a sondear para estos análisis. Panel: A - expresión AXL, B - GAS, y C - ARNm de β-actina. Los niveles de β-actina se muestran para un filtro representativo como control para carga de muestra equivalente, ARNm se preparó a partir de dos cultivos celulares que se hicieron crecer independientemente y se ensayó para determinar los niveles de expresión de los genes indicados.

Figura 5A y B. *Morfología de las estirpes celulares de BC MDA-MB-435S, BT549 y MDA-MB-231 (simulada) o que expresan de forma estable dnAXL cuando se cultivan en Matrigel.*

Las células se cultivaron en la parte superior de una capa de Matrigel durante 7-14 días.

A, se muestran fotografías que representan las tres morfologías básicas para las estirpes celulares de BC indicadas. B, ensayos de herida se muestran para MDA-MB-435S simulada y el clon 2 del mutante de dnAXL. La posición y tratamiento se indican en la Fig. El aumento fue x100.

Figura 6A, B y C. *Crecimiento 3D, comportamiento migratorio e invasivo de estirpe celular de BC MDA-MB-435S, simulada, que expresa de forma estable dnAXL o tras el tratamiento con anticuerpo anti-Ex-AXL.*

A. Las células se cultivaron sobre la parte superior de una capa de Matrigel durante 7-14 días (véase la leyenda a la Fig. 1). No se trataron o se trataron con anticuerpo según se indica.

B. Las actividades invasivas de la estirpe celular de BC indicada se midieron en cámaras de Boyden contando el número de células que atravesaron el filtro revestido con Matrigel (3-4 mg/ml) en 20-36 h según el procedimiento descrito en "Materiales y Métodos". Los datos son valores medios procedentes de al menos dos experimentos individuales que contienen puntos por triplicado. Barras de error.

C. Se ensayó la capacidad de migración en cámaras Transwell paralelas usando filtros sin Matrigel en las mismas condiciones que el ensayo de invasión. Los resultados mostrados son las medias de al menos dos experimentos que contienen puntos por triplicado (barras de error). La migración celular se evaluó también en una cámara de Boyden en ausencia de la barrera de Matrigel. Como era de esperar, las estirpes celulares MDA231, MDA435S, y BT549 son considerablemente más móviles que la estirpe celular débilmente invasiva MCF7 (no mostrada).

Figura 7. *Efecto de la transfección con AXL wt sobre células de cáncer de mama MCF7*

A. Los efectos morfológicos de la infección y sobreexpresión forzada de AXL wt. La sobreexpresión de AXL wt en células MCF7 da como resultado un cambio desde células con forma de adoquín compactas a células con formas irregulares con muchas extensiones que sobresalen.

B. Los efectos de la infección con AXL wt sobre la invasión celular se ensayaron en un ensayo con cámara de Boyden como se describe más abajo (véase Material y Métodos). Los clones MCF7-AXL wt fueron 30 veces más invasivos que las células infectadas con vectores vacíos.

Se sembró un total de 20.000 células en una cámara de Boyden durante 36-48 h (con poros de filtros de 8 µm, cubiertos con matriz de Matrigel a una concentración de 3-4 mg/ml). Las células infectadas con AXL wt se invaden mucho más pronto que las células infectadas con un control de un vector vacío o con una forma mutante de dnAXL.

Figura 8.

A. Análisis de transferencia Western de clones de células de glioma SF126 que expresan el vector de control (SF126 simulado), la forma de tipo natural de UFO/AXL (SF126-Ufo-WT), y la forma mutante dominante-negativa truncada de UFO/AXL (SF126-Ufo-DN). Las células sin suero se dejaron sin tratar (-) o se trataron con 200 µg/ml de Gas6 (+). Los lisados se transfirieron con suero antifosfotirosina (panel superior) o con un anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular de UFO/AXL humano (fila inferior). Comparados con las células SF126 simuladas, los análisis demostraron una señalización incrementada (aproximadamente 30%) y suprimida, mediada por Gas6/UFO/AXL, en células SF126-UFO-WT y SF126-UFO-DN, respectivamente. B-D. Expresión de la forma mutante dominante-negativa truncada de UFO/AXL en células SF126 (B) la expresión cambió su morfología cuando se compara con las células SF126 simuladas y SF126-UFO-WT (B y C).

Figura 9.

A. Análisis del volumen tumoral para clones de células SF126. Las células tumorales se implantaron subcutánea-
mente en ratones atímicos (n = 4 animales por grupo) y se siguieron durante 14 días. Se representan los valores de la
media $\pm$ SEM. *p < 0,05 frente a células SF126 simuladas. B. Análisis cuantitativo del área tumoral (panel izquier-
do) y densidad de vasos funcionales (panel derecho) tras el implante de clones de células SF126 en la cámara del
panículo cutáneo dorsal de ratones atímicos, según se evalúa mediante videomicroscopía de multifuorescencia intra-
vital (n = 4 animales por grupo). Se representan los valores de la media $\pm$ SD. Se llevó a cabo un análisis estadístico
mediante ANOVA, seguido del ensayo *post hoc* apropiado para comparaciones individuales entre grupos; *p < 0,05
frente a células SF126-Ufo-DN. C y D. Imágenes histomorfológicas representativas de tumores de SF126-UFO-WT
(C) y tumores de SF126-UFO-DN (D) que muestran diferencias en el volumen tumoral. Las barras indican 1 mm.
Tinción con H&E. E y F. Imágenes histomorfológicas representativas de tumores de SF126-UFO-WT (E) y tumores
de SF126-UFO-DN (F) que muestran diferencias en la invasión tumoral. Mientras que los tumores de SF126-UFO-
WT infiltraron masivamente el tejido subcutáneo y muscular de la piel adyacente (E) (las flechas indican restos de
capa muscular destruida), la invasión de las células tumorales de SF126-UFO-DN estuvo casi completamente inhibida
(F). Obsérvese estructura conservada de la capa muscular en (F). Las barras indican 100 μ m. Tinción con H&E. H e I.
Microscopía de fluorescencia sola (G) y en combinación con contraste de fases (H) que confirma la falta de invasión
de células tumorales SF126-UFO-DN en capas de tejidos adyacentes. Las células tumorales se marcaron con Dil antes
del implante. Las barras indican 100 μ m. Todos los especímenes se cortaron el día 21 tras el implante en la cámara
del panículo cutáneo dorsal de ratones atímicos. t, masa tumoral; m, capa muscular de la piel; sc, tejido subcutáneo.
SF126 simulada, controles; SF126-Ufo-WT, células que expresan la forma de tipo natural de UFO/AXL; SF126-Ufo-
DN, células que expresan la forma mutante dominante-negativa truncada de UFO/AXL.

Figura 10.

A. Ensayo de proliferación de MTT de clones de células SF126. En ausencia y presencia de Gas6 (200 μ g/ml). Las
células se dejaron sin tratar (-Gas6) o se trataron con 200 μ g/ml de Gas6 (+Gas6). El análisis se llevó a cabo después de
48 horas de cultivo. La velocidad de crecimiento se expresa con relación a células SF126 simuladas no estimuladas. Se
representan los valores medios. B y C. Formación de agregados multicelulares por clones de células SF126-Ufo-WT y
SF126-Ufo-DN que demuestran la capacidad inalterada para agregarse tras la inhibición de la función de UFO/AXL.
D. Migración de clones de células SF126 a lo largo de un período de observación de 7 días. El área de migración se
analizó planimétricamente por medio de un sistema de análisis de imágenes. Se representan los valores de la media $\pm$
SD. Se llevó a cabo un análisis estadístico usando ANOVA seguido de la prueba de la t de Student no emparejada. *p
< 0,05 frente a SF126 simulada. E y F. Análisis de la invasión de células tumorales mediante confrontación durante
48 horas de esferoides de células tumorales SF126-UFO-WT (E) o esferoides de células tumorales SF126-UFO-DN
(F) con agregados de células cerebrales de rata fetal. La frontera claramente cortada entre el esferoide de células
tumorales SF126-UFO-DN y el agregado de células cerebrales indica falta de capacidad de invasión tras la inhibición
de la función de UFO/AXL. B, agregado de célula cerebral; S, esferoide tumoral. SF126 simulada, controles; SF126-
Ufo-WT, células que expresan la forma de tipo natural de UFO/AXL; SF126-Ufo-DN, células que expresan la forma
mutante dominante-negativa truncada de UFO/AXL.

Figura 11.

A. Curva de supervivencia para ratones atímicos adultos tras el implante estereotáctico de células SF126-Ufo-WT
y células SF126-Ufo-DN en el cerebro (n = 4 animales por grupo). Los animales se sacrificaron tan pronto como
desarrollaron carencias neurológicas o perdieron >30% de su peso corporal inicial. B-E. Histomorfológica de tumores
de SF126-Ufo-WT tras el implante en el cerebro que muestra infiltración difusa de células tumorales en el tejido
cerebral adyacente. (B). Las células tumorales se infiltraron vía el espacio perivascular (C), a lo largo de conductos
de materia blanca (D), y a lo largo de la pared del sistema ventricular (E). Tinción con H&E. Las barras indican
100 μ m.

Ejemplos

A. Estudios de cáncer de mama y de próstata

1. Materiales y Métodos

1.1. Muestras tumorales y estirpes celulares

Para evitar cualquier tendencia de selección en cuanto al tipo y tamaño del cáncer de mama (BC) y otros tumores,
los ARN a ensayar se prepararon a partir de muestras sin seleccionar. Las muestras de carcinomas de mama invasivos
primarios se recogieron de 72 pacientes que sufrieron cirugía. Tras la resección quirúrgica, los tumores se macrodi-
seccionaron: una sección se tomó para el diagnóstico del patólogo, y un trozo adyacente se congeló rápidamente en
nitrógeno líquido para extracciones del ARNm. La edad media de paciente en el momento de diagnóstico fue 55 años
(intervalo de 29-81), y la mayoría de ellas fueron post-menopáusicas. Los tumores se clasificaron según la tipifica-

ción histológica de tumores de mama de la OMS: carcinomas ductales, carcinomas lobulillares, carcinomas ductales-lobulillares mixtos, y carcinomas medulares. El ADNc "normal" reunido, derivado de ARNm de mama normales (3) se usó como control y para normalización. Se evaluaron separadamente los perfiles de expresión de proteína cinasas (PK) y fosfatasas (PP) en los ADNc "normales" mencionados anteriormente. En este estudio también se incluyeron 21 estirpes celulares de BC y 3 estirpes de células epiteliales de mama normales. Las fuentes de las estirpes celulares de cáncer de mama fueron las siguientes: BT-20, BT-474, BT-483, BT-459, Du-4475, MDA-MB-134, -157, -175, -361, -436, -453, -468, SK-BR-3, y ZR-75-1, T-47D, MDA-MB-231, ZR-75-30 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). MCF-7, el clon y la estirpe celular de BC DAL fueron suministradas por SUGEN (Redwood City, CA). La estirpe celular HBL-100 procedió de ATCC. Esta estirpe celular derivó de tejido normal pero contiene secuencias de SV-40 integradas en forma de tándem (9). Los cultivos se mantuvieron en crecimiento exponencial en medio RPMI 1640, suplementado con 6 mM de glutamina, 10 μ g/ml de insulina humana y 10% de suero fetal de ternera (FCS) (CSL, Parkville, Australia). Las cepas de células epiteliales de mama normales MCF10A, MCF10 T-24 y MCF10 neo fueron proporcionadas por Dr. B. Gilles (Arizona Cancer center). Ac745 fue proporcionada por Dr. M. Stampfer, y se hizo crecer en el medio DMEM F12 suplementado por el medio de condición de Hs578Bst, insulina, hidrocortisona, EGF, toxina del cólera, vitaminas y antibióticos. Las células estaban libres de contaminación con micoplasma.

1.2. Aislamiento y fraccionamiento de ARN y ADN

El ARN total y el ADN genómico se aislaron del mismo pelete celular mediante lisis en disolución de isotiocianato de guanidinio (tampón de GTS: 4 M de isotiocianato de guanidinio, 25 mM de citrato de sodio pH 7 mO, 0,5% de Sarkosyl, y 0,1 M de β -mercaptoetanol), seguido de extracciones con fenol-cloroformo. El ARN total se aisló usando métodos estándar (Sambrook *et al.*, [1989]), con modificaciones. El ADN se recogió y se extrajo dos veces con un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). El ARN y el ADN se aislaron de cada estirpe celular en un mínimo de 3 ocasiones independientes.

La integridad de ARN total y ARNm, y la complejidad del ADNc, se controló mediante electroforesis en gel de agarosa y transferencias Northern usando sondas específicas. Parte de la extracción del ARNm se llevó a cabo usando el kit de aislamiento de ARNm OligoTex (Quagen, Biotech, Alemania). Los peletes celulares se resuspendieron en tampón de lisis/unión, se mezclaron mediante vórtex de forma breve, se hicieron pasar tres veces a través de una aguja de calibre 21 G y se aplicaron a una columna de lisado de giro y se centrifugó a 13.000 g durante 3 min. El lisado se mezcló entonces suavemente con celulosa Oligo-dT (Stratagene Inc.) y se aplicó a una columna de biología molecular prehumedecida Oligotex (Quagen, Biotech). La columna se lavó tres veces con tampón de lisis/unión y cuatro veces con tampón de lavado antes de eluir el ARNm con tampón de elución precalentado (65°C). La cantidad de ARNm se midió usando la OD260.

1.3. Preparaciones de chips de ADNc

La expresión génica de PK y PP se analizó mediante hibridación sobre chips de filtros de nailon con dianas radioactivas (ADNc). Los chips contenían 645 genes que codifican cinasas, fosfatasas y otras proteínas de señalización: ligandos, adaptadores, factores de transcripción, metaloproteinasas/ADAM, genes relacionados con la apoptosis y 11 genes de mantenimiento (la lista está disponible en <http://www.biochem.mpg.de> o ullrich@biochem.mpg.de). Su identidad se verificó mediante secuenciación de ADN plasmídico y se comparó con la información de secuencia de GenBank. La identidad de PK y PP se conformó para todos los clones colocados sobre filtros de nailon una vez, o por duplicado. Para los fines de normalización, el gen GFP se colocó dos veces, así como ADN genómico y vectorial. La purificación de plásmidos se realizó usando el kit de purificación de plásmidos (Qiagen, Alemania).

1.4. Hibridación de chips de ADNc

Los filtros se prelavaron inicialmente en 0,5% de SDS durante 5 minutos, sin agitación. En 10 ml de la disolución de prehibridación se incluyó ARNt de levadura. En la etapa de hibridación se usó ADN Cot-1 humano (BRL/Life technologies), que se llevó a cabo en una botella Roller (Hybaid Inc.) durante 16 h en un horno giratorio a 65°C. La sonda marcada se desnaturalizó durante 10 min. a 100°C y después se colocó inmediatamente en la mezcla de hibridación y se incubó durante otras 18 h a 65°C. Después de 18 h, la mezcla de hibridación se desechó y el chips se lavó dos veces en tampón de 2 cloruro de sodio:citrato de sodio (SSC), 0,2% de SDS durante 20 min. a 42°C con giro continuo en la incubadora. Se llevó a cabo un tercer lavado en 0,2 x SSC, 0,1% de SDS durante 15-60 min. a 65°C en una caja de plástico con agitación horizontal. Después del tercer lavado, el filtro se colocó sobre un trozo de papel Whatman humedecido, y se cubrió con un envoltorio Saran. El chip se colocó entonces en un casete formador de imágenes con una pantalla de almacenamiento Phosphorimager (Fuji, Japón) y se expuso durante 2 días.

1.5. Adquisición de imágenes y análisis

Las pantallas de almacenamiento del phospho-imager expuestas se barrieron una vez en un Phosphorimager Scanner (Fuji) a una resolución de 50 micrómetros, y se visualizaron usando MacBAS 2000 (Fuji). Las imágenes se importaron a un ArrayVision V (Canadá) para el análisis mediante un protocolo de software. El cartografiado de elementos individuales frente a una base de datos de referencia interna se logró alineando las imágenes sobre una matriz basada en software usando un total de 4 elementos de control que representan ADN de control genómico total, GFP, y vector. La normalización se llevó a cabo multiplicando la intensidad bruta para cada elemento de los datos por un factor de normalización igual a la intensidad bruta media para todos los elementos de los vectores divididos entre 100 (este valor es la intensidad bruta media para todos los elementos, derivado de un gran número de diferentes hibridaciones llevadas a cabo para el desarrollo de los chips). Las comparaciones por parejas a base de software de las imágenes normalizadas se realizaron frente a la imagen obtenida a partir de la hibridación de ADNc marcado tomado de ADNc “normal” reunido derivado de los ARN de mama normales, estirpes de células epiteliales de mama inmortales (preneoplásticas), como se indica anteriormente. Los cambios en los niveles de expresión se calcularon usando intensidades normalizadas, y se dan como relaciones (relaciones positivas indicaron un incremento en los niveles de transcritos; relaciones negativas indicaron una disminución en los niveles de transcritos), y se visualizaron mediante gráficas de transferencia de dispersión y el programa TreeView (13-16).

1.6. Análisis de los datos de chips

Antes del análisis de los resultados, se verificó la reproducibilidad de los experimentos comparando manchas por duplicado, y una hibridación con el mismo ADN sobre dos chips independientes, o dos hibridaciones independientes con ADNc preparado a partir del mismo ARN. En cada caso, los resultados mostraron una buena reproducibilidad con coeficientes de correlación respectivos 0,96, 0,98 y 0,98 (datos no mostrados). La reproducibilidad fue suficiente para considerar una diferencia de expresión de 2 veces como significativamente diferencial. El análisis subsiguiente se realizó usando un software de Excel y estadístico. La búsqueda de genes con niveles de expresión que se correlacionan con parámetros tumorales se realizó en varias etapas sucesivas. En primer lugar, los genes se detectaron comparando el nivel de expresión de la mediana en los dos subgrupos de tumores que difieren según los parámetros de interés. Se usaron los valores de la mediana en lugar de los valores medios debido a la elevada variabilidad de los niveles de expresión para muchos genes, que da como resultado un nivel de expresión de desviación estándar similar o superior al valor medio, y haciendo imposible las comparaciones con las medias. En segundo lugar, estos genes detectados se inspeccionaron visualmente en gráficas y, finalmente, se aplicó un análisis estadístico apropiado a aquellos que fueron convincentes para validar la correlación. La comparación de la expresión de HER2 entre tumores ER-positivos y tumores ER-negativos se validó usando un ensayo de Mann-Witney. Se usaron coeficientes de correlación para comparar los niveles de expresión génica con el número de nodos auxiliares implicados.

1.7. Análisis de agrupamientos

Los datos de este estudio se analizaron y presentaron como se describe (13-16). De forma breve, un algoritmo de agrupamiento jerárquico produce una tabla de resultados en la que los elementos/ADNc del chip (que representa genes específicos) están agrupados juntos basándose en similitudes en sus patrones de expresión génica.

El mismo algoritmo se aplica para agrupar las muestras experimentales (es decir, estirpes celulares y tumores) según las similitudes en sus patrones globales de expresión génica. Las tablas de datos, así ordenadas, se presentan gráficamente como imágenes coloreadas. A lo largo del eje vertical, los genes analizados se disponen según se ordenan mediante el algoritmo de agrupamiento, de forma que los genes con los patrones de expresión más similares se colocan adyacentes entre sí. A lo largo del eje horizontal, se disponen de forma similar muestras experimentales de forma que aquellas con los patrones de expresión más similares a lo largo de todos los genes se colocan adyacentes entre sí. El color de cada célula/cuadrado en esta imagen tabular representa la relación de expresión medida de cada gen en cuestión. La saturación del color también es directamente proporcional a la magnitud de la relación de expresión génica medida, teniendo los cuadrados rojos más brillantes la relación T/N más elevada (es decir, diferencia > 8 veces), teniendo los cuadrados verdes más brillantes la relación T/N más baja, indicando los cuadrados negros una relación de aproximadamente 1, e indicando los cuadrados grises una calidad insuficiente de datos.

1.8. Análisis de ARN mediante transferencia Northern

Se usó un protocolo estándar de análisis de transferencia Northern para la detección de la expresión de los genes AXL y GAS6 en la preparación de algunos cánceres de mama y de todas las estirpes celulares de cáncer de mama. Las muestras de ARN de carga se verificaron mediante rehibridación de filtros con una sonda de β -actina humana.

1.9. Ensayos de quimioinvasión y migración

El ensayo de quimioinvasión se llevó a cabo usando una modificación del método de Albini *et al.* (10). Tras la tripsinización, las células (20.000) se colocaron en insertos de filtros de polipropileno de 8 μm revestidos con Matrigel (150 μl de 4,0 mg/ml) en cámaras de Boyden (Biocoat Matrigel Invasion Chamber, Becton Dickinson, Bedford, MA, o insertos de cultivo tisular de 10 mm de Nunc, Naperville, IL). La cámara inferior contenía 0,55 ml de medio acondicionado con NIH3T3, producido como se describe por Albini *et al.*, o medio de crecimiento normal para algunas estirpes celulares.

Las estirpes celulares de BC obtenidas de la ATCC se tripsinizaron, se centrifugaron, y se resuspendieron a 4×10^6 células/ml en medio RPMI que contiene 10% de FBS. Las estirpes celulares restantes se resuspendieron en su medio de crecimiento habitual.

Después de 20-36 h, las células que quedan en el inserto se eliminaron con un tarugo de algodón, y las células en el fondo del filtro se contaron usando diferentes protocolos: fijadas en Diff-quick (American Scientific Products, McGraw Park, IL) y tratadas con RNasa A (a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 20 min. a 37°C) antes de teñir con yoduro de propidio (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS) durante 1 min. a temperatura ambiente (RT). Los filtros secos se retiraron y se montaron sobre portaobjetos con medio de montaje Cytoseal 60 (Stephens Scientific, Kalamazoo, MI). Se contaron los núcleos individuales teñidos con yoduro de propidio sobre los filtros. La mayoría de los resultados se obtuvieron usando tripsinización y contando las células. En cada experimento se contaron muestras por triplicado. Los valores alejados se eliminaron de las ecuaciones de actividad invasiva media.

Para ensayos de invasión en presencia de anticuerpo, las células se sembraron sobre Matrigel y, cuando se adhirieron, se añadió al medio el anticuerpo indicado. El anticuerpo estaba presente en la cámara superior durante toda la duración del ensayo; al final del ensayo, se ensayó la viabilidad celular en la cámara superior mediante azul tripán. La actividad de migración se determinó siguiendo el procedimiento descrito para el ensayo de invasión, excepto que las células se colocaron sobre la parte superior de filtros de polipropileno de 8 μm de poros sin revestir en cámaras de Boyden.

1.10. Crecimiento en Matrigel

La determinación de la morfología de células que se hicieron crecer en Matrigel se llevó a cabo como se describió previamente (10). De forma breve, células (5000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos) resuspendidas en 50 μl de medio de cultivo se colocaron en la parte superior de un revestimiento de Matrigel prefijado que consiste en 70 μl de Matrigel (Becton Dickinson) diluido hasta 6,0 mg/ml en sales de medio basal -RPMI. Tras la polimerización sobre la parte superior de estos 50 μl diluidos de Matrigel (1,0 mg/ml) se añadieron. El crecimiento de colonias se monitorizó durante el experimento y se fotografió a 7-14 días usando un microscopio Zeiss AxioVert 35 equipado con una cámara digital OpenLab (UK).

1.11. Ensayo de herida

Tras el ayuno nocturno, se realizaron heridas sobre monocapas de células confluentes con una punta de plástico. Las células MDA-MB-345S simuladas y MDA-MB-435-dnAXL, clon 2 se trataron con medio de cultivo (10% de FCS) y medio de cultivo que contiene GAS6 (200 ng/ml) durante 12, 24 y 48 h, antes de hacer fotos (contraste de fases). Para cuantificar la migración celular, se fotografiaron tres regiones escogidas al azar de una herida (1 mm de longitud) a un aumento de 40X; se midió una anchura media de herida cada 20 μm , y se calculó un cierre de herida en porcentaje medio. Se examinaron tres heridas independientes por muestra, y se calculó un cierre de herida en porcentaje medio.

1.12. El tratamiento de células con anticuerpo

Células de cáncer de mama (5000 para el ensayo de crecimiento 3D, y 20000 para el ensayo de invasión en una cámara de Boyden) se trataron mediante anticuerpo policlonal anti-Ex-AXL (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) usando 50 μl de anticuerpo y 500 μl de suspensión celular. Las células se incubaron con anticuerpo 60 min. a RT, y después se lavaron en PBS a RT. La colocación en placas de las células y el siguiente intervalo de tratamiento de 24 h se llevaron a cabo con la misma concentración de anticuerpo anti-Ex-AXL.

1.13. Infección de células BC con retrovirus recombinantes

Las formas AXLwt y mutante de dn-AXL de los virus se obtuvieron según un protocolo estándar (31) con modificaciones. De forma breve, se clonaron pLXSN-AXLwt y pLXSN-dnAXL vía los sitios EcoRI/BamHI y NotI/XbaI, subsiguientemente.

La estirpe celular de empaquetamiento Phoenix A se transfectó con estos vectores usando fosfato de calcio. El sobrenadante de las células Phoenix A transfectadas se recogió y se filtró a través de un filtro de 0,45 μm , para la infección de la estirpe celular cancerosa humana, y las células se incubaron con sobrenadante vírico durante 24 h. Después de 48 h, el medio se sustituyó por medio que contiene 400 $\mu\text{g/ml}$ de G 148. Para una selección adicional, las células se incubaron con G418 durante 14 días. Se generaron estirpes celulares policlonales y monoclonales mediante dilución limitada. La expresión de AXL se monitorizó mediante análisis de transferencia Western y de chips. Las estirpes celulares policlonales y tres estirpes celulares monoclonales con niveles de expresión similares de AXL wt y dn-AXL se escogieron para experimentos posteriores.

1.14. Anticuerpos

Se generaron anticuerpos específicos de AXL/UFO mediante inmunización de conejos con la proteína de fusión del dominio extracelular de GST-AXL recombinante que contiene restos de aminoácidos 1-410 (AXL-Ex). La proteína GST-AXL-Ex recombinante se segregó de forma estable por células HEK293 transfectadas (vector pcDNA3-GST). El medio de cultivo se recogió, y la proteína GST-AXL-Ex se purificó usando un protocolo estándar de etiqueta de GST (Pharmacia, Suecia). Los anticuerpos policlonales anti-AXL-Ex se purificaron parcialmente sobre columnas de afinidad de GST-Sepharose.

2. Resultados

El objeto de este estudio fue establecer los perfiles de expresión de proteína cinasa, fosfatasa y genes de señalización en células de cáncer de mama con el objetivo de identificar nuevos marcadores para determinar la capacidad de agresión del cáncer de mama. Para analizar los perfiles de expresión génica de 14 estirpes celulares de cáncer de mama débilmente invasivas, 7 estirpes celulares de cáncer de mama altamente invasivas y 3 estirpes de células epiteliales de mama normales (Tabla 1, Fig. 1, crecimiento 3D de estirpes celulares de BC invasivas y control) se usaron chips de hibridación de ADNc.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 343 950 T3

TABLA 1

Características de las estirpes celulares de cáncer de mama usadas para generar el consenso de capacidad de invasión

5	Origen del espécimen				Tumorigenicidad b	Morfología de Matrigel c
	de estirpe celular a					
10	Expresión del gen mar-					
	cador d					
		ER-		E-cad	Vim	
15	Débilmente invasiva					
	ZR-75-1					
	T47D		Ca ductal infil-+e			Fusionada
20			trante; PE			
		+	+ -			
	ZR75-1		Ca ductal infil-+e			Fusionada
25			trante; ascitis			
		+	+ -			
	MCF7		Adenocarcinoma de+e			Fusionada
30			mama; PE			
		+	+ -			
	MDA361		Adenocarcinoma de+e			Fusionada
35			mama; met de cere-			
			bro			
		+	+ -			
40	BT474		Ca ductal inva-+e			Fusionada
			sivo; PT			
		+	+ -			
45	BT20		Adenocarcinoma de +			Fusionada -
			mama; PT			
		ND	-			
50	MDA468		Adenocarcinoma +			Fusionada -
			metastásico; PE			
		-	- -			
55	SKBR3		Adenocarcinoma de+			Esférica
			mama; PE			
		-	- -			
60	MDA453		Ca de mama metas--			Esférica
			tásico; PE			
		-	- -			
65	BT483					

MDA175

Du44-75

DAL

ZR-75-30

HBL-100

Muy invasiva

MDA435S	Adenocarcinoma	+, met	Estrellada
	ductal metastásico		
BT549	Ca ductal invasivo-		Estrellada
	papilar; PT		
Hs578T	Ca ductal; PT	+, met	Estrellada
MDA231	Adenocarcinoma	de+, met	Estrellada
	mama; PE		
MDA436 en progreso			Estrellada
MDA415 en progreso			
MDA157 en progreso			Estrellada

Observaciones:

a) La información del origen del espécimen y de la evaluación patológica se obtuvieron del catálogo de ATCC. PT, tumor primario; PE, efusión pleural; Ca, carcinoma.

b) El dato de tumorigenicidad se dio a conocer en el catálogo de ATCC o en la Ref. 17. +, tumores palpables producidos como xenoinjertos en ratones atímicos o ratones SCID; -, no tumorigénico; met, estirpes celulares metastásicas según se da a conocer por las Refs. 18 y 19.

c) La descripción de la morfología de células cultivadas en Matrigel y su actividad en el ensayo de invasión de la cámara de Boyden se tomó de la Ref. 10.

En estos estudios se usaron membranas de microchips de ADNc que contienen 650 genes. Las diferencias en la expresión génica entre células de BC débil y altamente invasivas se identificaron de forma que permitieron la definición de "consenso de capacidad de invasión" para cada fenotipo invasivo (Fig. 2, agrupamiento AXL, correlación >0,71). Las estirpes celulares de BC altamente invasivas (BT549, MDA-MB-237, MDA-MB-436, MDA-MB-415, Hs578T, MDA-MB-157 y MDA-MB-435S) sobreexpresaron AXL y muestran un perfil de expresión génica definido que las discrimina de estirpes celulares de BC débilmente invasivas y de células epiteliales de mama "normales". Este agrupamiento incluyó genes ya conocidos como marcadores de capacidad de invasión (CD44, VIM, CAVI, 2 y las MMP (Ref. 20-27)). Algunos de estos genes sólo se han considerado en busca de la asociación con la capacidad de invasión de células cancerosas (M-CSF y EPHA2 (Ref. 28-30) y Tabla 2). Otros genes del agrupamiento se identificaron por primera vez como genes asociados con la capacidad de agresión de células cancerosas: : AXL, GAS, MMP14, Adam12, Adam17, MT3MMP, FGF2 y 5, Fyn, Lyn, DDR2, TIMP1, HB-EGF, SGK, S6KII, MAP4K4, SIRPα y Anexina 2.

De forma destacable, ninguna de estas estirpes celulares de BC expresó el receptor de estrógenos (véase la Fig. 3, como se indica por las características de las estirpes celulares de BC). El agrupamiento de AXL de los genes coexpresados se identificó en estirpes celulares de BC primario (Fig. 3) y otros tumores y estirpes celulares cancerosas (riñón, próstata y glioblastomas) igualmente (datos no mostrados). La expresión de los genes AXL y GAS en estirpes celulares de BC invasivas se conformó mediante hibridación de transferencia Northern (Fig. 4).

El mutante dominante-negativo del gen AXL (dnAXL) que se sobreexpresó de forma estable en estirpes celulares de BC muy invasivas suprimió de forma muy importante la capacidad de invasión, migración y supervivencia de las varias estirpes celulares de BC: MDA-MB-435S, BT549 y MDA-MB-231 parcialmente (Fig. 5A y B). Todos los clones que tienen expresión de dn-AXL estable tuvieron un crecimiento 3D en la matriz de Matrigel como las estirpes celulares de cáncer de mama no invasivas o débilmente invasivas, por ejemplo MCF7. La expresión de dn-AXL inhibe significativamente la señalización de GAS6 y da como resultado una fosforilación de AXL reducida o ausente con el tratamiento de GAS. También se bloqueó la señalización de ERK2 en estas células.

Un anticuerpo policlonal dirigido contra la porción extracelular de AXL (que contiene restos de aminoácidos 1-410, Ex-AXL) altera la morfología celular (Fig. 6A) y tiene una actividad inhibidora muy fuerte sobre la migración e invasión de las estirpes celulares de BC MDA-MB-435S y BT549 (Fig. 6B y C). Se obtuvieron resultados similares con la estirpe celular de cáncer de próstata PPC1. Además, la sobreexpresión de AXL de tipo natural (wt) en la estirpe celular de BC débilmente invasiva MCF7 y en la estirpe celular de cáncer de próstata LNCaP dio como resultado una transformación en un fenotipo muy invasivo.

B. Estudios con glioblastomas

1. Material y Métodos

1.1 Células de glioma humano

En este estudio se usaron las siguientes estirpes celulares de glioma humano: U-118, U-1242, SF126, A-172, U-373, U-1240, T-98G, SF763, y SF767. Todas las células se hicieron crecer en suero fetal bovino al 10% (PAA GmbH, Linz, Austria) a 37°C en incubadoras humidificadas con 5% de CO₂, y se ensayaron de forma habitual en busca de contaminación con micoplasma con tinción Hoechst 33258. Se usaron los medios de crecimiento (todos de Gibco, Karlsruhe, Alemania) según lo siguiente: DMEM para U-118, T-98G, y SF763; MEM, aminoácidos no esenciales (dilución 1:100 de madre; Gibco), 1 mM de piruvato sódico para U-1242; DMEM con 4,5 g/l de glucosa para SF-126, A-172, y U373; y MEM para U-1240 y SF767. Antes del implante tumoral en la preparación de la cámara de panículo cutáneo dorsal, las células se tiñeron con Dil como se describió previamente (Referencia 35).

1.2 Hibridación de chips de ADNc

El contenido del chip de ADNc así como su técnica de hibridación se ha descrito previamente con detalle (Referencia 31). El chip comprendió 125 fragmentos de ADNc, y corresponden a 84 RTK y 30 proteína tirosina fosfatasas, más ADNc de control. Las sondas de ARN total, poly(A) + ARN, y ADNc se generaron como se describió en otra parte (Referencia 31). El marcado de 3-5 µl de ADNc se llevó a cabo con el kit Megaprime (Amersham) en presencia de 50 µCi de [³²P]dATP. La disolución de prehibridación se sustituyó por la disolución de hibridación que contiene 5x SSC, 0,5% (v/v) de SDS, 100 µg/ml de ARNt de levadura de cocina (Roche), y la sonda de ADNc marcada (2-5 x 10⁶ cpm/ml), y se incubó a 68°C durante 16 h. Las membranas se lavaron en condiciones restrictivas. Para cuantificar las señales de hibridación, se usó un sistema phosphorimager (Fuji BAS 1000; Fuji). Los valores medios para cada ranura se calcularon usando la fórmula: A = (AB - B) x 100/B; [A, volumen final; AB, intensidad de cada señal de ranura (píxel/mm²); B, fondo (píxel/mm²)]. Los resultados del chip de ADNc se tuvieron que confirmar mediante análisis de RT-PCR como se describe previamente (Referencia 31).

1.3 Generación de constructos de expresión y estirpes celulares estables

Las secuencias de ADNc de 2,7 kpb que codifican AXL se clonaron en los sitios de restricción EcoRI/BamHI del vector retrovítico pLXSN. La variante dominante-negativa se generó subclonando el fragmento de EcoRI/FspI de 1,5 kpb en el mismo vector. Los plásmidos de expresión y el vector vacío se transfectaron en células Phoenix-Ampho usando un método de coprecipitación con fosfato de calcio. Los sobrenadantes que contienen retrovirus recombinantes se cosecharon 28 h después de la transfección, se mezclaron con Polybrene a una concentración final de 8 µg/ml, y se aplicaron durante 3 h a células SF126 subconfluentes. La infección se repitió dos veces con sobrenadante reciente de las mismas células productoras. Las células infectadas se hicieron pasar después de un día y se seleccionaron con 1 mg/ml de G418 durante dos semanas. Las estirpes celulares monoclonales se seleccionaron en busca de expresión elevada de AXL según se monitoriza mediante análisis de transferencia Western.

1.4 Inmunoprecipitación y transferencia Western

Las células se lisaron con 50 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 10% de glicerol, 1% de Triton X-100, 10 mM de $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ suplementado con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de aprotinina, 1 mM de PMSF, 2 mM de Na_3VO_4 , 10 mM de NaF. Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante el ensayo de proteína micro BCA (PIERCE, Rockford, Illinois). AXL se precipitó en 1,8 mg de proteínas celulares totales usando 30 μl de suspensión de proteína A Sepharose (CL-4B, Amersham Biosciences, Freiburg, Alemania) y 3 μl de suero de conejo policlonal anti-AXL (Referencia 36) toda la noche a 4°C. Los precipitados se lavaron tres veces con tampón HNTG (20 mM de Hepes pH 7,5, 150 mM de NaCl, 10% de glicerol, 0,1% de Triton X-100). Los inmunoprecipitados o 200 μg de proteínas celulares totales por línea se mezclaron con tampón de muestra reductor, se separaron mediante 7,5% de SDS-PAGE, y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Protran; Schleicher&Schuell, Dassel, Alemania). Las membranas se bloquearon con 0,25% de gelatina en 150 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl pH 7,5, 5 mM de EDTA, 0,05% de Triton X-100, y se incubaron toda la noche a -4°C con anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina diluido con G410 1:5000 en el mismo tampón. Se aplicó anticuerpo secundario anti-ratón de cabra HRP (1:10000, BioRad) durante 60 min. a temperatura ambiente. Las membranas se separaron durante 90 min. a 55°C antes de volver a sondear con anti-AXL (suero de conejo policlonal, 1:1000) y proteína A-HRP (BioRad, 1:40000). La detección se llevó a cabo con reactivos Western Lightning (Perkin Elmer Life Sciences, Boston).

1.5 Ratones

Se criaron ratones atímicos (un/un; macho/hembra) y se mantuvieron en un entorno libre de patógeno específico y se usaron a las 6-10 semanas. Los experimentos se llevaron a cabo según el protocolo institucional aprobado y las guías del Institutional Animal Care and Use Committee. Para los procedimientos quirúrgicos, los ratones se anestesiaron mediante inyección s.c. de quetamina/xilacina.

1.6 Xenoinjertos subcutáneos y ortotópicos

Se hicieron crecer subcutáneamente xenoinjertos de glioma tras la inyección de 1×10^8 células C6 (Referencia 44) en las regiones del flanco izquierdo de ratones atímicos. El crecimiento tumoral se evaluó usando calibradores vernier hasta el día 14 después del implante. El volumen del tumor se calculó como (longitud x anchura x altura)/2. Para el implante de células tumorales intracerebral, la cabeza de ratones atímicos se fijó en un soporte de cabeza de roedores estereotáctico. El implante se llevó a cabo inyectando 5×10^5 células estereotácticamente en el estriado derecho. Todos los animales se sacrificaron tan pronto como los animales en un grupo experimental desarrollaron deficiencias neurológicas o perdieron >30% de su peso corporal, a fin de comparar el crecimiento tumoral.

1.7 Modelo de la cámara de panículo dérmico dorsal

Dos marcos de titanio simétricos flanquearon el panículo dérmico dorsal de animales para hacer un sándwich con la capa doble extendida de la piel y crear la cámara de panículo dérmico dorsal que consiste en una capa de músculo estriado, tejido subcutáneo, y epidermis. Una ventana de observación, cubierta con un cubreobjetos de vidrio, permitió la observación microscópica intravital repetida de la microvasculatura del crecimiento tumoral en la cámara. Dos días después de la preparación de la cámara, el cubreobjetos de la cámara del panículo dérmico dorsal se retiró temporalmente para el implante de células tumorales. Los animales toleraron bien las cámaras del panículo dérmico y no mostraron signos de desagrado o cambios en el comportamiento del sueño ni de la alimentación.

1.8 Microscopía de multifuorescencia intravital

Se llevó a cabo una videomicroscopía de epifluorescencia intravital a lo largo de 21 días tras el implante (Referencias 37, 38, 39). El marcado con Dil de las células de glioma permitió la delineación precisa del tumor a partir del tejido hospedante adyacente, así como la identificación de células tumorales individuales aplicando epiiluminación con luz verde (520-570 nm). La potenciación del contraste con dextrano conjugado con FTIC (MW = 150.000; 0,1 ml i.v.) y el uso de la epiiluminación con luz azul (450-490 nm) se aplicó para visualizar los vasos sanguíneos individuales. El crecimiento tumoral se evaluó midiendo el área tisular cubierta por la masa tumoral marcada fluorescentemente. El análisis de la microvasculatura del hospedante y del tumor incluyó la densidad de los vasos y el diámetro vascular (Referencia 37).

1.9 Histología

Al terminar los experimentos, las preparaciones de la cámara del panículo dérmico dorsal y los cerebros que contienen el glioma se disecaron libres, y se congelaron en nitrógeno líquido para el análisis histomorfológico. Las secciones se montaron en cabos, embebidos en Tissue-Tek (Miles Laboratories Inc., Naperville, IL) y se congelaron en 2-metilbutano (E. Merck, Darmstadt, Alemania) enfriado con N_2 líquido. Se cortaron secciones axiales en serie (5 μm) y se montaron en portaobjetos prerrevestidos con gelatina (Sigma). Las secciones se tiñeron con Harris Hematoxilina y eosina G (Merck) según procedimientos estándar.

1.10 Ensayo de proliferación

La proliferación de estirpes celulares de glioma se evaluó en un ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). Las células se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a una concentración de 3000 células/pocillo y se cultivaron durante 48 horas en ausencia o en presencia de Gas6 (200 µg/ml). Las células se ensayaron entonces para determinar sus capacidades para reducir el colorante de MTT hasta un producto de formazano coloreado, como un índice de la proliferación celular.

1.11 Ensayo de migración

Se produjeron esferoides de células de glioma sembrando 5×10^6 células en medio de cultivo en un matraz de 75 cm² previamente revestido en la base con 1,0% de agar Noble (DIFCO, Detroit, MI.). Después de 7-10 días en cultivo, los esferoides con un diámetro menor de 300 µm se escogieron para los estudios de migración en invasión. Los esferoides de glioma se colocaron en el centro de placas de 24 pocillos. El área cubierta por las células tumorales que migran desde el explante de los esferoides se usó como un índice de la migración celular. Se midieron diariamente dos diámetros ortogonales de cada área del explante usando un microscopio de contraste de fases durante un período de 7 días, y se calculó el área media cubierta por las células tumorales. Los ensayos de migración se realizaron por cuadruplicado.

1.12 Ensayo de invasión

Se generaron agregados celulares de cerebro de rata fetal según un procedimiento estandarizado, que se describió previamente (Referencia 40). De forma breve, se retiraron fetos de rata BD IX de 18 días mediante sección por cesárea. Los cerebros se disecaron cuidadosamente, se cortaron, y se tripsinizaron en serie. Después de la centrifugación, se sembraron 1×10^7 células (resuspendidas en medio) en pocillos revestidos por agar de una placa de 24 pocillos. Después de 2 días de reagregación, los esferoides se transfirieron a pocillos recientes (cinco a siete agregados/pocillo), donde maduraron durante 18 a 21 días. En ese momento, se habían formado agregados de cerebros maduros. Los agregados de cerebro de rata fetal y los esferoides de glioma representan masas estandarizadas, primarias, avasculares de cerebro y de tumor que se parecen a los tejidos cerebrales y de glioma *in situ*, proporcionando así un modelo adecuado para investigar la migración de células de glioma y la invasión independiente de la vasculatura *in vitro*. Para el ensayo de invasión, se colocaron agregados de cerebros maduros individuales (diámetro = 250-300 µm) en placas de 96 pocillos revestidas con agar. Esferoides de glioma individuales, de tamaño similar, también se transfirieron a los pocillos y se pusieron en contacto con los agregados cerebrales. Las confrontaciones se cultivaron durante 24 y 48 h respectivamente, después de lo cual se cosecharon, se fijaron en paraformaldehído y se embebieron en resina plástica para la preparación de secciones semidelgadas (2 µm). Las secciones se tiñeron con azul de toluidina. El proceso de invasión celular de gliomas se evaluó para determinar la cantidad de agregado de cerebro de rata que permanece intacto. Los ensayos de invasión se llevaron a cabo por cuadruplicado.

1.13 Estadística

Para el análisis de diferencias entre los grupos, se llevó a cabo un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido del ensayo *post hoc* apropiado para comparaciones individuales entre los grupos. Los resultados con $p < 0,05$ se consideraron significativos.

2. Resultados

2.1

Para estudiar la relevancia de UFO/AXL en la biología de células de glioma, se introdujo en células de glioma SF126 (SF126-Ufo-DN), usando un sistema de expresión retrovítico, una forma mutante dominante-negativa, truncada, de UFO/AXL humano que carece del dominio que posee RTK intracelular. Las células transfectadas con un vector vacío (SF126 simuladas) o con una forma de tipo natural humana de UFO/AXL (SF126-Ufo-WT) sirvieron como controles. La transferencia Western con un anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular de UFO/AXL humano confirmó los niveles de expresión elevados del receptor de tipo natural y truncado en los clones de células SF126-Ufo-DN (Fig. 8A, panel inferior). Para averiguar si la expresión del receptor truncado bloqueó la transducción de la señal de UFO/AXL, se determinó la fosforilación del receptor de UFO/AXL tras la estimulación con su ligando Gas6 (Fig. 8A, línea superior). En células SF126 simuladas, se observó una señal de referencia moderada, que incrementó con la estimulación con Gas6. En SF126-Ufo-WT, la señal inducida por Gas6 se incrementó. Por el contrario, en células SF126-Ufo-DN, la fosforilación tanto de referencia como inducida por Gas6 estaban casi completamente suprimidas.

El bloqueo de la señalización de UFO/AXL tuvo profundos efectos sobre la morfología de las células de glioma, en condiciones de cultivo normales y en ausencia de su ligando. Mientras que las células SF126 simuladas y SF126-Ufo-WT (Figs. 8B y C) presentaron una morfología con forma alargada, de husillo, con múltiples contactos célula

con célula, las células SF126-Ufo-DN se caracterizaron por una morfología redonda y redujeron los contactos célula con célula (Fig. 8D). También, parece que las células SF126-Ufo-DN perdieron su capacidad para adherirse bien al plástico.

2.2

A fin de estudiar la relevancia de UFO/AXL para el crecimiento tumoral, se implantaron 1×10^6 células de cada clon subcutáneamente en el flanco de ratones atímicos adultos. Cuando se comparó con las células SF126 simuladas, la tumorigenicidad de las células SF126-Ufo-DN se vio alterada drásticamente, dando como resultado un crecimiento tumoral reducido un 97% (Fig. 9A). Por el contrario, el crecimiento tumoral se aceleró ligeramente en células SF126-Ufo-WT (Fig. 9A). A fin de obtener una idea más detallada del papel de UFO/AXL en la biología de células de glioma *in vivo*, se implantaron células SF126-Ufo-WT y células SF126-Ufo-DN en el modelo de cámara transparente de panículo dérmico dorsal de ratones atímicos adultos. Tras el marcado fluorescente de células tumorales y la administración sistémica de marcadores plasmáticos fluorescentes, este modelo permite una evaluación repetible y no invasiva del crecimiento tumoral, del comportamiento de células tumorales, de la angiogénesis tumoral y de la perfusión tumoral mediante videomicroscopía de multifuorescencia intravital. Usando este enfoque, se pudo confirmar la significancia de la señalización de UFO/AXL para el crecimiento tumoral.

En comparación con los tumores de SF126-Ufo-WT, la expansión de los tumores de SF126-Ufo-DN se suprimió significativamente (Fig. 9B). Un mecanismo mediante el cual UFO/AXL puede influir sobre el crecimiento tumoral y la expansión es su modulación de la función de los vasos sanguíneos y el suministro sanguíneo nutritivo al tumor. Esta hipótesis se apoya por recientes estudios que sugieren que la señalización mediada por Gas6/UFO/AXL puede interferir con la cascada de coagulación así como con la formación y maduración de vasos sanguíneos (Referencia 41, 42). Para ensayar esto, se analizaron cuantitativamente la densidad de los vasos funcionales de los tumores y el diámetro de los microvasos como marcadores de la angiogénesis tumoral y de la perfusión tumoral. Sin embargo, como se ilustra en la Figura 9B, estos análisis no pudieron apoyar una explicación vascular (por ejemplo anti-angiogénesis, fracaso de la perfusión debido a la trombosis de los vasos tumorales) para la drástica inhibición del crecimiento tumoral de SF126-Ufo-DN.

El análisis histomorfológico de las muestras tumorales enfatizó además la hipótesis de que la señalización de UFO/AXL desempeña un papel central para la biología de células de glioma. Como se demuestra en las Figs. 9C y E, los tumores de SF126-Ufo-WT se caracterizaron por una gran masa tumoral sólida así como por invasión masiva y destrucción subsiguiente del tejido hospedante adyacente (es decir, tejido muscular y subcutáneo) por células tumorales individuales. Por el contrario, los tumores de SF126-Ufo-DN fueron mucho más pequeños y no invadieron los tejidos hospedantes circundantes (Figs. 9D y F). Esta falta de invasión tisular por el tumor de SF126-Ufo-DN se confirmó además por microscopía de fluorescencia y de contraste de fases de secciones congeladas, demostrando la falta de células SF126-Ufo-DN marcadas con Dil en el tejido adyacente (Figs. 9G y H).

2.3

A fin de revelar adicionalmente los mecanismos que subyacen a la supresión del crecimiento tumoral vía el bloqueo de la función de UFO/AXL, se analizó *in vitro* el comportamiento de células de glioma. Los ensayos con MTT demostraron que la proliferación de células SF126-Ufo-DN en condiciones de cultivo normales se redujo en un 50% y 35% cuando se comparan con las células SF126 simuladas y SF126-Ufo-WT, respectivamente (Fig. 10A). Digno de mención, este resultado fue independiente de la estimulación con el ligando Gas6 de UFO/AXL, que confirma la hipótesis previa de que la señalización de Gas6/Ufo/AXL no ejerce una actividad mitógena. Puesto que se ha sugerido que UFO/AXL media la adhesión célula-célula (Referencia 43), también se estudió la capacidad de las células para formar agregados multicelulares. Las células SF126 simuladas y SF126-Ufo-WT formaron fácilmente esferoides (Fig. 10B). Su capacidad para agregarse no se atenuó en células SF126-Ufo-DN (Fig. 10C), lo que confirma que la agregación celular está mediada únicamente por el dominio extracelular de UFO/AXL, independiente del dominio de tirosina cinasa. Después, se puso atención sobre la migración de células de glioma colocando en placas los esferoides tumorales inhibiendo a lo largo del tiempo la distancia de las células tumorales que migran desde el esferoide que las origina. Mientras que las células SF126 simuladas y SF126-Ufo-WT migraron distancias comparables, la migración de células tumorales se vio alterada de forma muy importante en células SF126-Ufo-DN (Fig. 10D). Puesto que la migración celular es un prerrequisito para la invasión tumoral, finalmente se puso atención a la capacidad de invasión de los clones de células SF126 confrontando esferoides tumorales con agregados celulares de cerebro de rata fetal. Tras 48 horas de cocultivo, tanto las células SF126 simuladas como SF126-Ufo-WT invadieron difusamente el agregado cerebral (Fig. 10E). Por el contrario, después del mismo período de tiempo, se pudo observar una frontera clara entre el esferoide tumoral de SF126-Ufo-DN y el agregado de células cerebrales, indicando que estas células fueron incapaces de invadir el tejido cerebral normal (Fig. 10F).

De forma colectiva, la histomorfología de los xenoinjertos tumorales y los resultados *in vitro* presentes proporcionaron pruebas claras de que UFO/AXL modula significativamente el crecimiento, migración e invasión de células de glioma, y que la inhibición de la señalización de UFO/AXL suprime la expansión tumoral bloqueando el crecimiento en invasión de células tumorales en el tejido adyacente. Para ensayar la capacidad de UFO/AXL para ser una nueva diana para el tratamiento de glioma maligno, se implantaron células SF126-Ufo-WT y células SF126-Ufo-DN en los

cerebros de ratones atímicos adultos, y se evaluó su supervivencia. Los animales se sacrificaron tan pronto como desarrollaron deficiencias neurológicas o perdieron >30% de su peso corporal inicial. Los tumores de SF126-Ufo-WT se caracterizaron por un curso clínico agresivo por cuanto todos los animales se tuvieron que sacrificar a los 8 días debido a un deterioro clínico rápido (Fig. 11A). Por el contrario, los animales que poseen tumores de SF126-Ufo-DN sobrevivieron durante el mismo período de observación libres de síntomas y sin pérdida de peso (peso corporal día 0 = 29 ± 2 g frente al peso corporal día 8 = 28 ± 1 g) (Fig. 11A). El análisis histomorfológico reveló que las células SF126-Ufo-WT se infiltraron de forma difusa en el parénquima cerebral, mientras que el efecto de ocupación del espacio de la masa tumoral sólida fue sólo moderado (Fig. 11B). Aquí, se pudo observar la media típica de la invasión de células tumorales humanas: a lo largo del espacio perivascular (Fig. 11C), a lo largo de los conductos de materia blanca (Fig. 11D), y a lo largo de la pared del sistema ventricular (Fig. 11E). Por el contrario, la formación del tumor de SF126-Ufo-DN no se pudo identificar en ninguno de los animales.

2.4 Sumario

En resumen, los resultados de los presentes análisis sugieren un nuevo papel fundamental para RTK UFO/AXL en la biología de tumores cerebrales malignos. Los hallazgos indican que UFO/AXL es sobreexpresado por un número significativo de estirpes celulares de glioma humano, hasta un grado que es comparable con EGFR o PDGFR- α , y que media el crecimiento de gliomas así como la invasión de los gliomas. Hasta ahora, UFO/AXL es la primera RTK que se da a conocer que está implicada en la invasión de gliomas y, por lo tanto, representa una diana terapéutica nueva para interferir con estos tumores tremendamente agresivos así como refractarios a la terapia. Esto está apoyado por los presentes resultados que demuestran que la inhibición de la señalización de UFO/AXL suprime el crecimiento de gliomas y prolonga la supervivencia tras implante ortotópico.

A fin de estudiar la función biológica de UFO/AXL, se analizó con detalle esta capacidad del complejo de células de glioma humano para interaccionar entre sí y la matriz. Como resultado, se pudo demostrar que la inhibición de la función de UFO/AXL expresando un mutante receptor dominante-negativo truncado suprime casi completamente la capacidad de las células para migrar e invadir tejido cerebral sano. Se debería observar que la forma mutante de UFO/AXL que se utilizó en los presentes experimentos careció del dominio intracelular, estando todavía funcionalmente intacto el dominio extracelular. En consecuencia, UFO/AXL no media la invasión de células tumorales simplemente a través de una interacción del receptor con la matriz, sino más bien a través de la implicación de la cascada de señalización del complejo aguas abajo del receptor. Además, los presentes resultados también sugieren que UFO/AXL está implicado en la proliferación de células tumorales, nuevamente de forma potencial a través de la modulación de las interacciones célula-célula y célula-matriz.

El sistema nervioso central se caracteriza por una expresión destacada de UFO/AXL, su ligando Gas6, y RTK relacionadas, tales como Tyro 3 o Mer. Los hallazgos del presente estudio indican ahora que la señalización de Gas6/UFO/AXL puede ser parte del sistema molecular que orquesta la migración y guía de neuronas y gliocitos. Además, la expresión destacada de UFO/AXL y su ligando Gas6 tanto por el tejido del hospedante como por el tejido tumoral puede proporcionar una pista para una mejor comprensión de la capacidad invasiva única de tumores que se originan en el cerebro.

C. Discusión

El hecho de que RTK AXL como un solo gen sea suficiente para inducir metástasis tumoral en sistemas experimentales es sorprendente, debido a que contrasta con la opinión actual de que la adquisición de un fenotipo metastásico es un proceso de múltiples etapas que implica varios sucesos genéticos y epigenéticos.

Tanto los tumores benignos como malignos crecen de forma descontrolada. Pero sólo las células de tumores malignos invaden los tejidos circundantes y viajan a distintos órganos (se metastatizan). Una comprensión de la base molecular para esta capacidad de agresión podría conducir a terapias que bloqueasen la transición de un tumor de benigno a maligno, y mantuviesen controlada una enfermedad local. Ahora se han identificado proteínas denominadas AXL y GAS como un par receptor-ligando en un punto de comprobación molecular que regula no sólo la capacidad de invasión sino también la supervivencia y movimiento de células tumorales - el trío de características requerido para la metástasis. El complejo dn-AXL/GAS6 también suprime la capacidad antiapoptótica de células tumorales.

Los presentes datos muestran que el tratamiento con GAS de las células BT-549 (expresión estable de dn-AXL) en presencia de suero no es capaz de inducir la activación de ERK1/2 MAPK. De este modo, esta ruta de señalización bloquea eficazmente la supresión de AXL.

En resumen, los presentes datos han demostrado que AXL/GAS desempeñan un papel clave en cánceres humanos al influir en la invasión de células tumorales. La proteína AXL es una nueva diana para el diagnóstico y tratamiento contra el cáncer (anticapacidad de invasión). Por ejemplo, la expresión de dnAXL en células cancerosas puede evitar que invadas y desarrollen metástasis. Además, se pueden usar genes de la agrupación de AXL (enumerados en la Tab. 2) como herramienta de diagnóstico para la detección del desarrollo en la etapa preinvasiva en tumores primarios, particularmente tumores primarios de mama, próstata, riñón y glioblastomas.

D. Conclusiones

1. Usando el análisis de chips de ADNc de estirpes celulares de BC, tumores primarios y células de glioblastoma, se ha identificado un “consenso de capacidad de invasión” (agrupamiento AXL). Este consenso de capacidad de invasión, que comprende 32 genes, se puede usar para predecir la capacidad de agresión de células cancerosas y tumores primarios.
2. Un mutante dominante negativo de AXL (dn-AXL) suprime fuertemente la invasión de estirpes celulares de cáncer de mama muy invasivas, y también incrementa su sensibilidad a la retirada del suero (apoptosis). Un anticuerpo policlonal dirigido contra la porción extracelular de AXL (que contiene los restos de aminoácidos 1-410, Ex-AXL) es capaz de suprimir la agresividad de las células cancerosas tratadas.
3. RTK AXL como un gen individual es suficiente para inducir capacidad de invasión de células cancerosas de mama en sistemas experimentales (véase 2 y datos sobre sistemas modelo BC - MCF7-wt AXL y estirpe celular de cáncer de próstata - LNCaP-wt AXL). Este resultado contrasta con la actual opinión de que la adquisición de un fenotipo metastásico es un proceso de múltiples etapas que implica varios sucesos genéticos y epigenéticos.
4. RTK AXL es un buen candidato para estrategias de tratamiento de “terapia de transducción de señales”, en las que se seleccionan como dianas rutas clave para la señalización celular hiperactiva que provoca invasividad y metástasis del cáncer. La supresión de la función de señalización de AXL por un mutante dn-AXL y/o por tratamiento con un anticuerpo inhibidor no puede ser evitado por rutas colaterales o compensatorias.
5. La supresión de la expresión del gen AXL en terapia tumoral se puede llevar a cabo mediante inhibición de AXL a nivel génico o de transcrito, por ejemplo transferencia génica de mutantes, moléculas antisentido, ribozimas, siRNA, RNAi o supresores de la expresión del gen AXL, o a nivel proteico, por ejemplo mediante inhibidores de AXL cinasa de bajo peso molecular, análogos de AXL, por ejemplo proteínas de fusión Ex-AXL tales como una fusión de Ex-AXL con un fragmento Fc de JgG1 (ref. 32) o anticuerpos inhibidores. Además, la supresión de la expresión del gen AXL puede verse afectada por inhibidores de la señal de AXL, por ejemplo inhibidores aguas abajo.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 343 950 T3

TABLA 2

Consenso de capacidad de invasión

Estirpes celulares de cáncer de mama y control		
n°	Genes de agrupación de AXL	Función conocida o implicación
1	AXL/GAS	proliferación, adhesión, función antiapoptótica, no asociado aún con invasión
2	HBEGF	EGF de unión a heparina
3	EPHA2	implicado en cáncer de mama, cáncer de próstata, melanomas, vascularización de glioblastomas
4	S6KII	STK, S6 cinasa 2 ribosómica, no asociado aún con invasión
5	SGK	STK, cinasa regulada por glucocorticoides, función antiapoptótica, implicado en la supervivencia de células
6	ADAM17	TACE implicado en desprendimiento del receptor TNF alfa
7	Lyn/Fyn	quinasas de la familia SRC
8	MAP4K4	STK, activa JNK (pero no p38 ni ERKS), puede estar implicado en señalización de TNF alfa, similar a SLK

ES 2 343 950 T3

9	CD44/META1	marcador de la capacidad de invasión de células cancerosas
10	ADAM12	interacciona con integrinas, coexiste con SRC y GRB2 en perturbaciones de membrana, dominio citoplásmico implicado en señalización vía SH3
11	Caveolina 1, 2	papel clave en la señalización, asociado con transformación celular, promueve la invasión celular
12	M-CSF	ligando para CSP-R1, vasculogénesis, expresado constitutivamente por células de cáncer de mama invasivas
13	MMP14	expresión única en células endoteliales, específico para desprendimiento de CD44
14	Vimentina	asociado con transformación celular, promueve la migración e invasión celular, marcador de la transición epitelial-mesenquimal de células cancerosas
15	SIRP alfa	adhesión, señalización, migración, la implicación en la invasión es desconocida

TABLA 3

n°	Marcadores de mancha (clasificación HUGO)	Acceso	Gen- bank/Lonk	Publicación
1	AXL (tirosina cinasa receptora de AXL)	M76125	<u>M76125</u>	Mol. Cell. Biol. 11 (10), 5016-5031 (1991)
2	ADAM12 (una desintegrina y un dominio de metaloproteinasa 12=meltrina alfa)	AF023476	<u>AF023476</u>	J. Biol. Chem. 273 (1), 157-166 (1998)
3	ADAM17 (una desintegrina y un dominio de metaloproteinasa)	U69611	<u>U69611</u>	Nature 385 (6618), 729-733 (1997)

ES 2 343 950 T3

17=TACE)

- | | | | |
|----|--------------------------------|------------------|--------------------------|
| 4 | ANXA2 (Anexina A2,D00017 | <u>D00017</u> | Cell 46 (2), 191-199 |
| 5 | unión a p35 src) | | (1986) |
| 5 | CAV1 (caveolina 1,Z18951 | <u>Z18951</u> | FEBS Lett. 314 (1), 45- |
| 10 | proteína caveolae, | | 48 (1992) |
| 6 | CAV2 (caveolina 2) AF035752 | <u>AF035752</u> | Proc. Natl. Acad. Sci. |
| 15 | | | U.S.A. 93 (1), 131-135 |
| 7 | CD44 (antígeno = im-X66733 | <u>X66733</u> | J. Invest. Dermatol. 99, |
| 20 | plicado en adhesión de | | 381-385 (1992) |
| 8 | DDR2 (familia de re-X74764 | <u>X74764</u> | Oncogene 8 (12), 3433- |
| 25 | ceptores del dominio | | 3440 (1993) |
| 25 | de discoidina, miembro | | |
| 9 | 2) | | |
| 30 | FGF2 (factor 2 de cre-NM002006 | <u>NM 002006</u> | EMBO J. 5 (10), 2523- |
| 30 | cimiento de fibroblas- | | 2528 (1986) |
| 35 | tos (básico)) | | |
| 10 | FGF5 (factor 5 de cre-NM004464 | <u>NM 004464</u> | Mol. Cell. Biol. 8 (8), |
| 35 | cimiento de fibroblas- | | 3487-3495 (1988) |
| 40 | tos) | | |
| 11 | EPHA2 (EphA2= receptorM59371 | <u>M59371</u> | Mol. Cell. Biol. 10 |
| 40 | 2L tipo a de efrina) | | (12), 6316-6324 (1990) |
| 12 | GAS6 (ligando de AXL,L13720 | <u>L13720</u> | Mol. Cell. Biol. 13 (8). |
| 45 | específico 6 de la | | 4976-4985 (1993) |
| 45 | detención del creci- | | |
| 50 | miento) | | |
| 13 | FRK (cinasa relaciona-U00803 | <u>U00803</u> | Gene 138, 247-251 (1994) |
| 50 | da con fyn) | | |
| 14 | (HB-EGF)DTR (factor deNM001945 | <u>NM 001945</u> | Science 251, 936-939 |
| 55 | crecimiento similar al | | (1991) |
| 55 | factor de crecimiento | | |
| 60 | epidérmico que se une | | |
| 60 | a heparina) | | |
| 15 | LYN (tirosina-proteínaM16038 | <u>M16038</u> | Mol. Cell. Biol. 7 (1), |
| 65 | cinasa) | | 237-243 (1987) |
| 16 | PTPNS1 (PTP, sustratoY103T5 | <u>Y10315</u> | Nature 386 (6621), 181- |

ES 2 343 950 T3

	1 de tipo no receptor		186 (1997)
	1)		
5	17 MMP1 (metaloproteinasasM13509	<u>M13509</u>	J. Biol. Chem. 261,
	de la matriz 1= cola-		6600-6605 (1986)
	genasa intersticial)		
10	18 MMP14 (metaloproteína-NM004995	<u>NM 004995</u>	Nature 370 (6484), 61-65
	sa de la matriz 14		(1994)
	(insertada en membra-		
15	na))		
	19 MMP2 (metaloproteinasasNM004530	<u>NM 004530</u>	J. Biol. Chem. 263,
	de la matriz 2, gela-		6579-6587 (1988)
20	tinasa A)		
	20 MMP9 (metaloproteinasasNM004994	<u>NM 004994</u>	J. Biol. Chem. 264 (29),
	de la matriz 9 = gela-		1 721 3-1 7221 (1989)
25	tinasa B)		
	21 MAP4K4 (cinasa 4 deXM038748	<u>NT 022171</u>	Presentación directa
	proteína cinasa acti-		
30	vada por mitógenos)		
	22 MT3MMP, o MMP16 (meta-NM005941	<u>XM 042409</u>	J. Biol. Chem. 270
	loproteínasa de la		(39),23013-23020 (1995)
35	matriz 16 (insertada		
	en la membrana))		
	23 TIMP1 (inhibidor tisú-NM003254	<u>NM 003254</u>	Nature 315 (6022), 768-
40	lar de metaloproteína-		771 (1985)
	sa 1)		
	24 VIM (vimentina) X56134	<u>X56134</u>	Nucleic Acids Res. 18
45			(22), 6692 (1990)
	26 SGK (cinasa reguladaY10032	<u>Y10032</u>	Proc. Natl. Acad. Sci.
	por sue-		U.S.A. 94(9),
50	ro/glucocorticoide)		4440-4445 (1997)
	26 RPS6KB1 (proteína S6M60724	<u>M60724</u>	Mol. Cell. Biol. 11,
	cinasa ribosómica,		5541-5550 (1991)
55	70kD, polipéptido 1)		
	27 FYN (tirosina-proteínaM14333	<u>M14333</u>	Proc. Natl. Acad. Sci.
	cinasa protooncogénica		U.S.A. 83,
60	(syn)		5459-5463 (1986)

65

ES 2 343 950 T3

TABLA 4

Expresión de EGFR y UFO/Axl en estirpes celulares de glioma humano según se evalúa mediante chip de ADN de tirosina cinasa

estirpe celular	EGFR	UFO/Axl	UFO/Axl: EGFR
U-118	169	1793	10,6
U-1242	324	1793	5,5
SF126	296	1612	5,4
A-172	438	1935	4,4
U-373	56	190	3,4
U-1240	139	262	1,9
T-98G	540	800	1,5
SF763	5526	39	0,0
SF767	1039	--	0,0

Referencias

1. J.W. Janssen, A.S. Schulz, A.C. Steenvoorden *et al.*, A novel putative tyrosine kinase receptor with oncogenic potential. *Oncogene* 6 (1991), p. 2113-2120.
2. J. O'Bryan, R.A. Frye, P.C. Cogswell *et al.*, AXL, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* 11 (1991), p. 5016-5031.
3. Healy, A. M., Schwartz, J. J., Zhu, X., Herrick, B. E., Varnum, B., Farber, H. W. (2001). Gas 6 promotes AXL-mediated survival in pulmonary endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 280: 1273L-1281.
4. A. Neubauer, A. Fiebeler, D.K. Graham *et al.*, Expression of axl, a transforming receptortyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis. *Blood* 84 (1994), p. 1931-1941.
5. P. McCloskey, J. Pierce, R.A. Koski, B. Varnum y E.T. Liu, Activation of the AXL receptor tyrosine kinase induces mitogenesis and transformation in 32D cells. *Cell Growth Differ.* 5 (1994), p. 1105-1117.
6. P. Bellosta, Q. Zhang, S.P. Goff y C. Basilico, Signalling through the ARK tyrosine kinase receptor protects from apoptosis in the absence of growth stimulation. *Oncogene* 15 (1997), p. 2387-2397.
7. S. Goruppi, E. Ruaro y C. Schneider, Gas6, the ligand of AXL tyrosine kinases receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 12 (1996), p. 471-480.
8. P. McCloskey, Y.W. Fridell, E. Attar *et al.*, GAS6 mediates adhesion of cells expressing the receptor tyrosine kinase AXL. *J. Biol. Chem.* 272 (1997), p. 23285-3291.
9. Caron de Fromentel C., Nardeux P. C., Soussi T., Lavialle C., Estrade S., Carloni G., Chandrasekaran K., Cassingena R. Epithelial HBL-100 cell line derived from milk of an apparently healthy woman harbors SV40 genetic information. *Exp. Cell Res.*, (1985), 160: 83-94.
10. Albin A., Iwamoto Y., Kleinman H. K., Martin G. R., Aaronson S. A., Kozlowski J. M., McEwan R. N. A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res.*, 47: 3239-3245, 1987.
11. Thompson E. W., Paik S., Brunner N., Sommers C. L., Zugmaier G., Clarke R., Shima T. B., Torri J., Donahue S., Lippman M. E.; *et al.* Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J. Cell. Physiol.*, 150: 534-544, 1992.

12. **Terranova V. P., Hujanen E. S., Martin G. R.** Basement membrane and the invasive activity of metastatic tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.* (Bethesda), 77: 311-316, 1986.

13. **Perou C. M., Jeffrey S. S., van de Rijn M., Rees C. A., Eisen M. B., Ross D. T., Pergamenschikov A Williams C. F., Zhu S. X., Lee J. C., Lashkari D., Shalon D., Brown P. O., Botstein D.** Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 9212-9217, 1999.

14. **Perou C. M., Sorlie T., Eisen M. B., van de Rijn M., Jeffrey S. S., Rees C. A., Pollack J. R., Ross D. T., Johnsen H., Akslen L. A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S. X., Lonning P. E., Borresen-Dale A. L., Brown P. O., Botstein D.** Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* (Lond.), 406: 747-752, 2000.

15. **Johnston M.** Gene chips: array of hope for understanding gene regulation. *Curr. Biol.*, 8: R171-174, 1998.

16. **Duggan D. J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P., Trent J. M.** Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat. Genet.*, 21: 10-14, 1999.

17. **Price J. E., Polyzos A., Zhang R. D., Daniels L. M.** Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res.*, 50: 717-721, 1990.

18. **Sommers C. L., Byers S. W., Thompson E. W., Torri J. A., Gelmann E. P.** Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.*, 31: 325-335, 1994.

19. **Deborah A. Zajchowski, Marty F. Bartholdi, Yan Gong, Lynn Webster, Hsiao-Lai Liu, Alexander Munishkin, Catherine Beauheim, Susan Harvey, Stephen P. Ethier y Paul H. Johnson.** Identification of Gene Expression Profiles That Predict the Aggressive Behavior of Breast Cancer Cells. *Cancer Research* 61, 5168-5178, 1 de julio de 2001.

20. **A. Wimmel, M. Schilli, U. Kaiser et al.,** Preferential histiotypic expression of CD44-isoforms in human lung cancer. *Lung Cancer* 16 (1997), p. 151-172.

21. **Subburaj Ilangumaran, Anne Briol, y Daniel C. Hoessli.** CD44 Selectively Associates With Active Src Family Protein Tyrosine Kinases Lck and Fyn in Glycosphingolipid-Rich Plasma Membrane Domains of Human Peripheral Blood. Lymphocytes. *Blood*, Vol. 91 No. 10 (15 de mayo), 1998: p. 3901-3908

22. **Domagala W., Lasota J., Bartowiak J., Weber K., Osborn M.** Vimentin is preferentially expressed in human breast carcinomas with low estrogen receptor and high Ki-67 growth fraction. *Am. J. Pathol.*, 136: 219-227, 1990.

23. **Domagala W., Wozniak L., Lasota J., Weber K., Osborn M.** Vimentin is preferentially expressed in high-grade ductal and medullary but not in lobular breast carcinomas. *Am. J. Pathol.*, 137: 1059-1064, 1990.

24. **Hayashi K, Matsuda S, Machida K, Yamamoto T, Fukuda Y, Nimura Y, Hayakawa T, Hamaguchi M.** Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhus breast cancers. *Cancer Res* 15 de marzo de 2001; 61 (6):2361-4.

25. **Yang G, Truong LD, Timme TL, Ren C, Wheeler TM, Park SH, Nasu Y, Bangma CH, Kattan MW, Scardino PT, Thompson TC.** Elevated expression of caveolin is associated with prostate and breast cancer. *Clin Cancer Res* agosto de 1998; 4(8):1873-80.

26. **Bachmeier BE, Nerlich AG, Lichtinghagen R, Sommerhoff CP.** Matrix metalloproteinases (MMPs) in breast cancer cell lines of different tumorigenicity. *Anticancer Res* Nov-Dic de 2001; 21(6A):3821-8.

27. **Sounni NE, Devy L, Hajitou A, Frankenne F, Munaut C, Gilles C, Deroanne C, Thompson EW, Foidart JM, Noel A.** MT1-MM P expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *FASEB J* abril de 2002; 16(6):555-64.

28. **Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW.** Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med* 19 de marzo de 2001; 193(6):727-40.

29. **Pederson L, Winding B, Foged NT, Spelsberg TC, Oursler MJ.** Identification of breast cancer cell line-derived paracrine factors that stimulate osteoclast activity. *Cancer Res* 15 de noviembre de 1999; 59(22):5849-55.

30. **Kelly Carles-Kinch, Katherine E. Kilpatrick, Jane C. Stewart y Michael S. Kinch.** Antibody Targeting of the EphA2 Tyrosine Kinase Inhibits Malignant Cell Behavior. *Cancer Research* 62, 2840-2847, 15 de mayo de 2002.

31. **Bange J., Prechtel D., Cheburkin Y., Specht K., Harbeck N., Schmitt M., Knyazeva T., Muller S., Gartner S., Sures I., Wang H., Imyanitov E., Haring HU, Knyazev P., Iacobelli S., Hofer H., Ullrich A.** Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg(388) allele. *Cancer Res.* 1 de febrero de 2002, 62(3), 840-7.

32. **Yanagita M., Arai H., Ishii K., Nakano T., Ohashi K., Mizuno K., Varnum B., Fukatsu A., Doi T., Kita T.** Gash regulates mesangial cell proliferation through AXL in experimental glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.*, abril de 2001, 158(4), 1423-32.
- 5 33. **Attar E.C., Fridell Y.C., Xu L., Jin Y., Maia D.M., Schell M.J., y Liu E.T.** AXL receptor tyrosine kinase expression in human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, (Oct. de 1997) Vol. 46, nº 1, p. 91.
34. **Dodge Zantek N., Walker-Daniels J., Stewart J., Hansen R., Robinson D., Miao H., Wang B., Kung H-J., Bissell M. J. y Kinch M.** MCF-10A-neoSt: A New Cell System for Studying Cell-ECM and Cell-Cell Interactions in
10 Breast Cancer. *Clinical Research*, Vol. 7, 3640-3548, noviembre de 2001.
35. **Vajkoczy, P., Goldbrunner, R., Farhadi, M., Vince, G., Schilling, L., Tonn, J. C., Schmiedek, P., y Menger, M. D.** Glioma cell migration is associated with glioma-induced angiogenesis *in vivo*, *Int J Dev Neurosci.* 17:557-63, 1999.
15
36. **Sasaki, T., Knyazev, P. G., Cheburkin, Y., Gohring, W., Tisi, D., Ullrich, A., Timpl, R., y Ho-henester, E.** Crystal structure of a C-terminal fragment of growth arrest-specific protein Gas6. Receptor tyrosine kinase activation by laminin G-like domains, *J Biol Chem.* 277: 44164-70., 2002.
- 20 37. **Vajkoczy, P., Schilling, L., Ullrich, A., Schmiedek, P., y Menger, M. D.** Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: an intravital multifuorescence microscopic approach in the athymic nude mouse, *J Cereb Blood Flow Metab.* 18: 510-520, 1998.
38. **Vajkoczy, P., Farhadi, M., Gaumann, A., Heidenreich, R., Erber, R., Wunder, A., Tonn, J. C., Menger, M. D., y Breier, G.** Microtumor growth initiates angiogenic sprouting with simultaneous expression of VEGF, VEGF
25 receptor-2, and angiopoietin-2, *J Clin Invest.* 109: 777-85., 2002.
39. **Read, T. A., Farhadi, M., Bjerkvig, R., Olsen, B. R., Rokstad, A. M., Huszthy, P. C., and Vajko-czy, P.** Intravital microscopy reveals novel antivasular and antitumor effects of endostatin delivered locally by alginate-
30 encapsulated cells, *Cancer Res.* 61: 6830-7., 2001.
40. **Bjerkvig, R., Laerum, O. D., y Mella, O.** Glioma cell interactions with fetal rat brain aggregates *in vitro* and with brain tissue *in vivo*, *Cancer Res.* 46: 4071-9., 1986.
- 35 41. **Stitt, T. N., Conn, G., Gore, M., Lai, C., Bruno, J., Radziejewski, C., Mattsson, K., Fisher, J., Gies, D. R., Jones, P. F., et al.** The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases, *Cell.* 80: 661-70., 1995.
42. **Fridell, Y.W., Villa, J., Jr., Attar, E. C., and Liu, E. T.** GAS6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular
40 smooth muscle cells, *J Biol Chem.* 273: 7123-6., 1998.
43. **Bellosta, P., Costa, M., Lin, D. A., y Basilio, C.** The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding, *Mol Cell Biol.* 15: 614-25., 1995.
- 45 44. **Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A (1994)** Glioblastoma growth inhibited *in vivo* by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature (Lond.)* 367: 576-579.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para determinar la capacidad de invasión de cáncer, que comprende medir en una muestra que comprende células cancerosas la expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en AXL y GAS6, en el que una expresión elevada se correlaciona con una elevada capacidad de invasión.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende medir la expresión de los genes AXL y GAS6.

3. El método de la reivindicaciones 1 ó 2, que comprende medir la expresión de al menos el gen AXL.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el cáncer se selecciona de cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de colon y glioblastomas.

5. El método de la reivindicación 4, en el que el cáncer es glioblastoma.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la expresión se determina a nivel de ARNm.

7. El método de la reivindicación 6, en el que la expresión se determina en un chip de ácidos nucleicos.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la expresión se determina a nivel proteico.

9. El método de la reivindicación 8, en el que la expresión se determina mediante un inmunoensayo.

10. Un método para identificar y/o **caracterizar** un inhibidor de la capacidad de invasión de cáncer, que comprende determinar si un compuesto de ensayo es capaz de inhibir el gen AXL, el gen ligando AXL, la proteína AXL y/o el ligando de la proteína AXL.

11. El método de la reivindicación 10, que comprende determinar si un compuesto de ensayo es capaz de unirse a la proteína AXL y/o reducir la expresión del gen AXL.

12. El método de la reivindicación 10 u 11, en el que se usa un sistema de ensayo a base de células.

13. El método de la reivindicación 10 u 11, en el que se usa un sistema de ensayo libre de células.

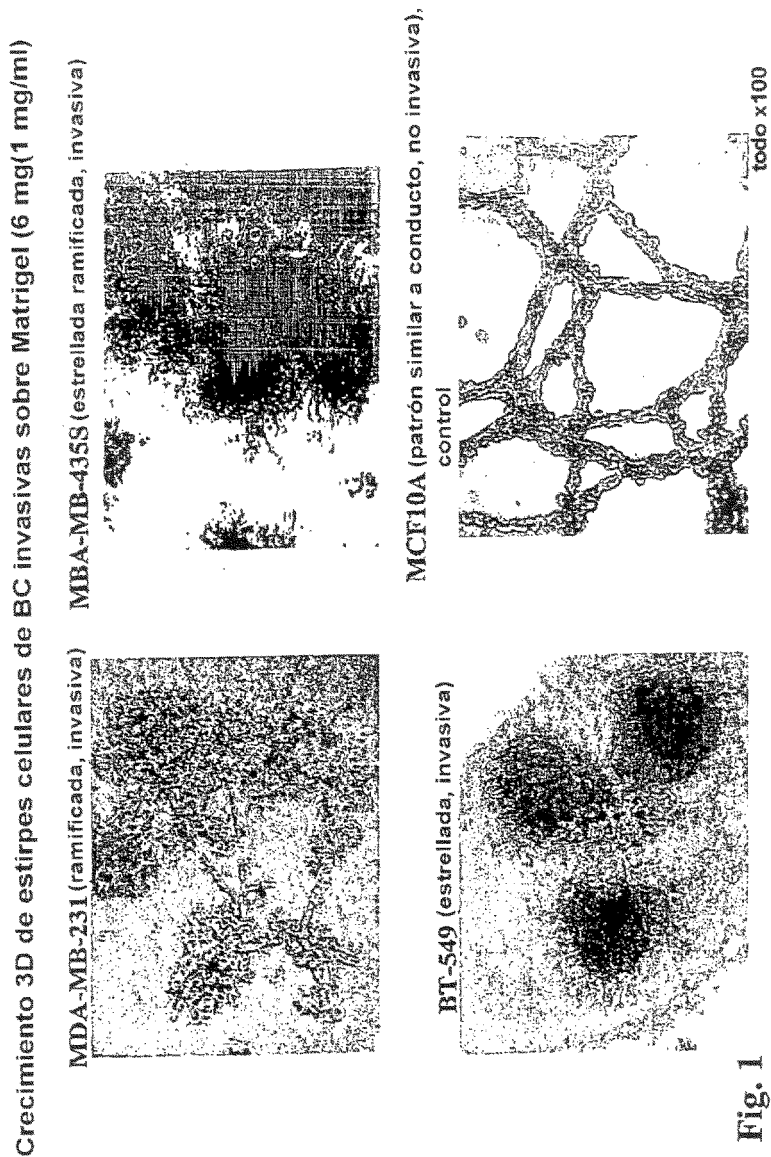
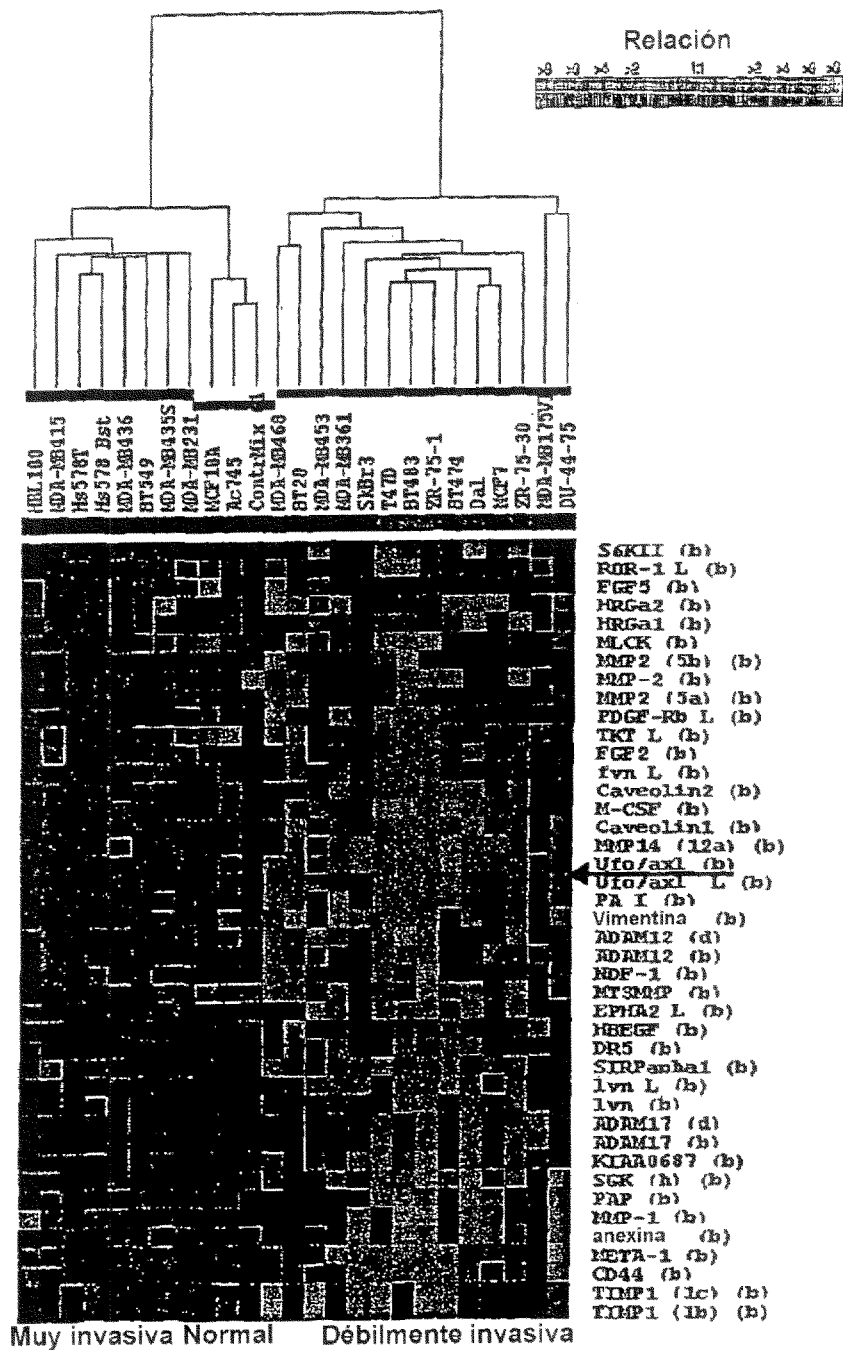
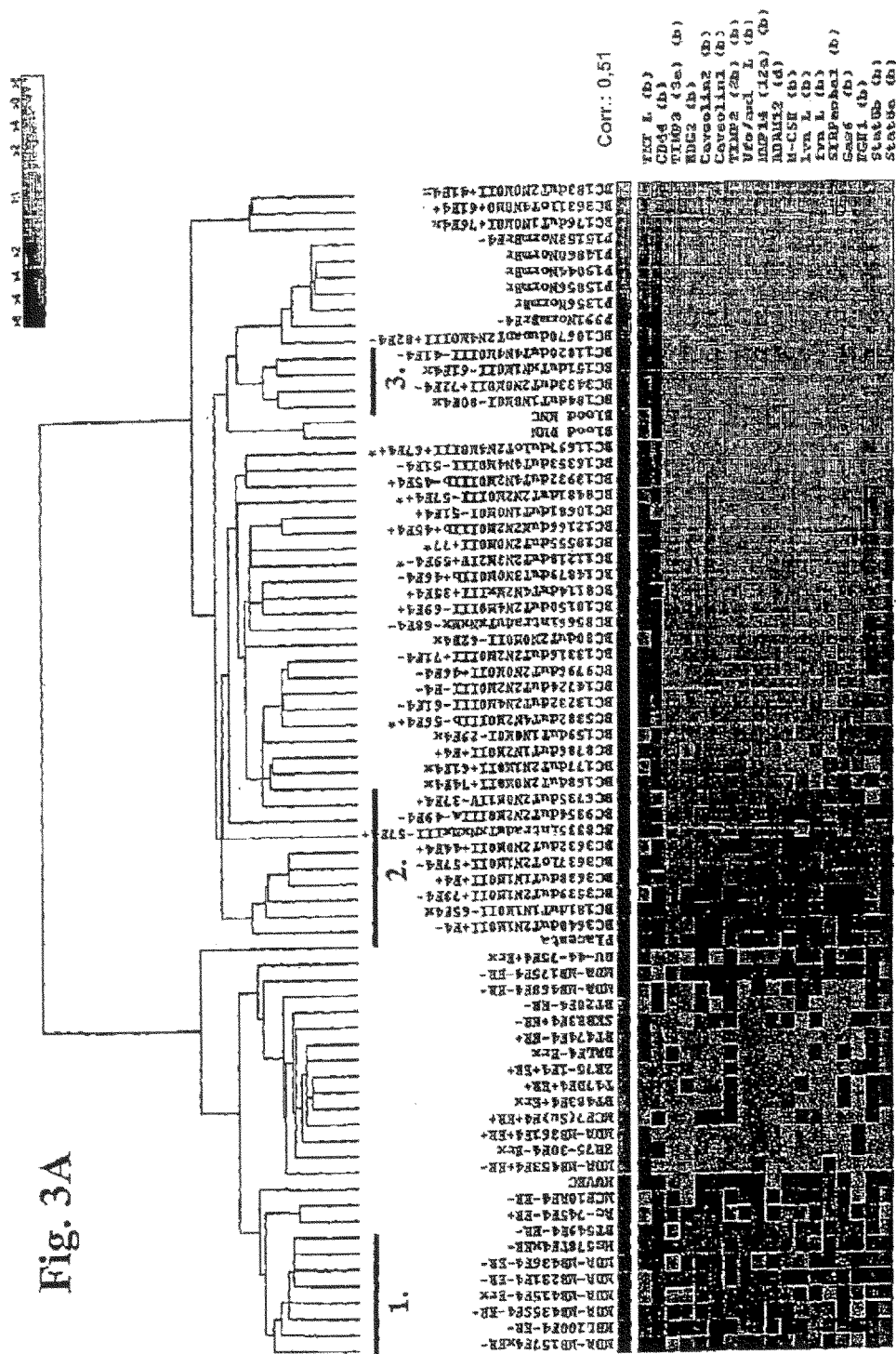
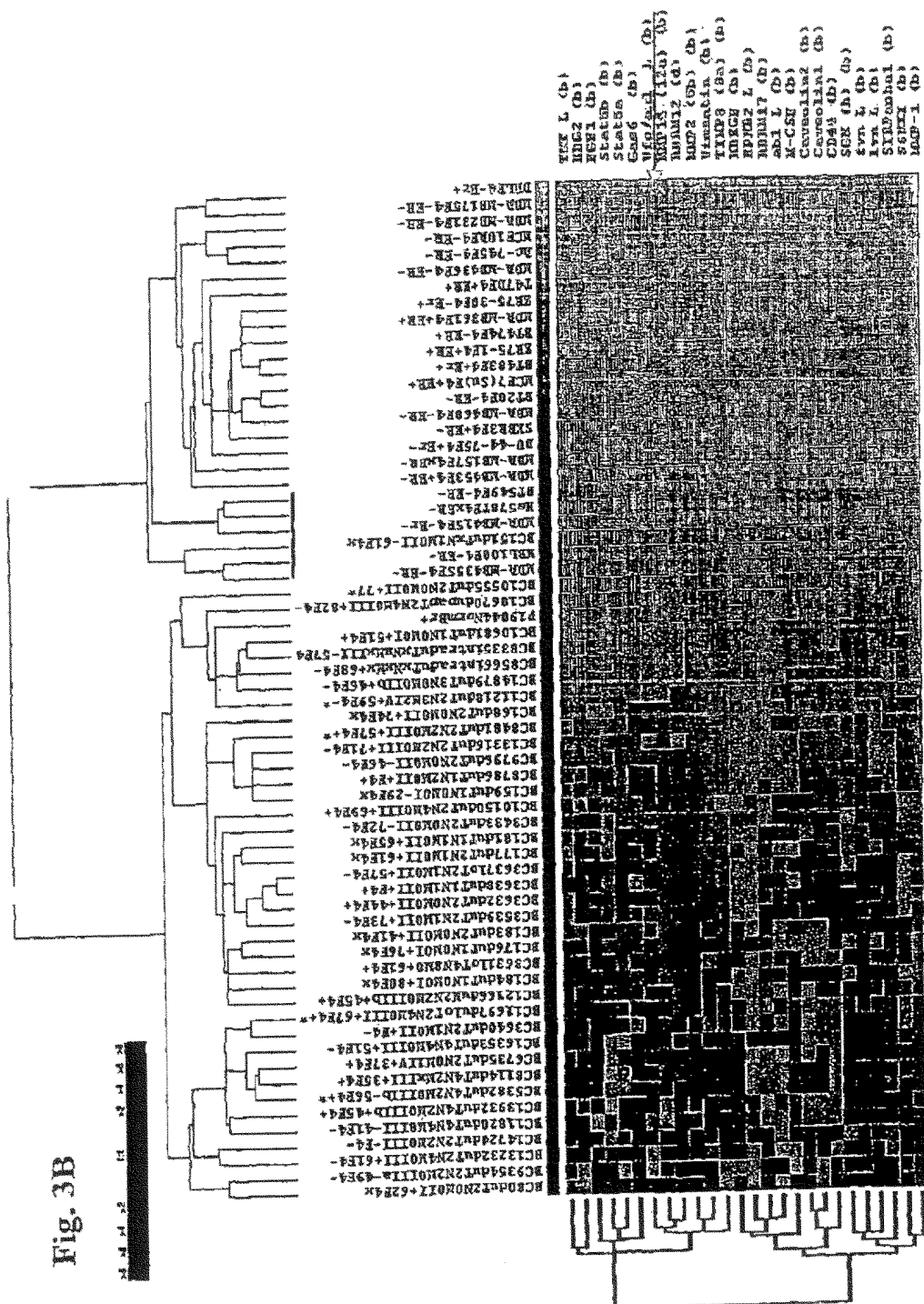


Fig. 1

Fig. 2







Análisis de la expresión de RTK AXL y GAS mediante transferencia Northern

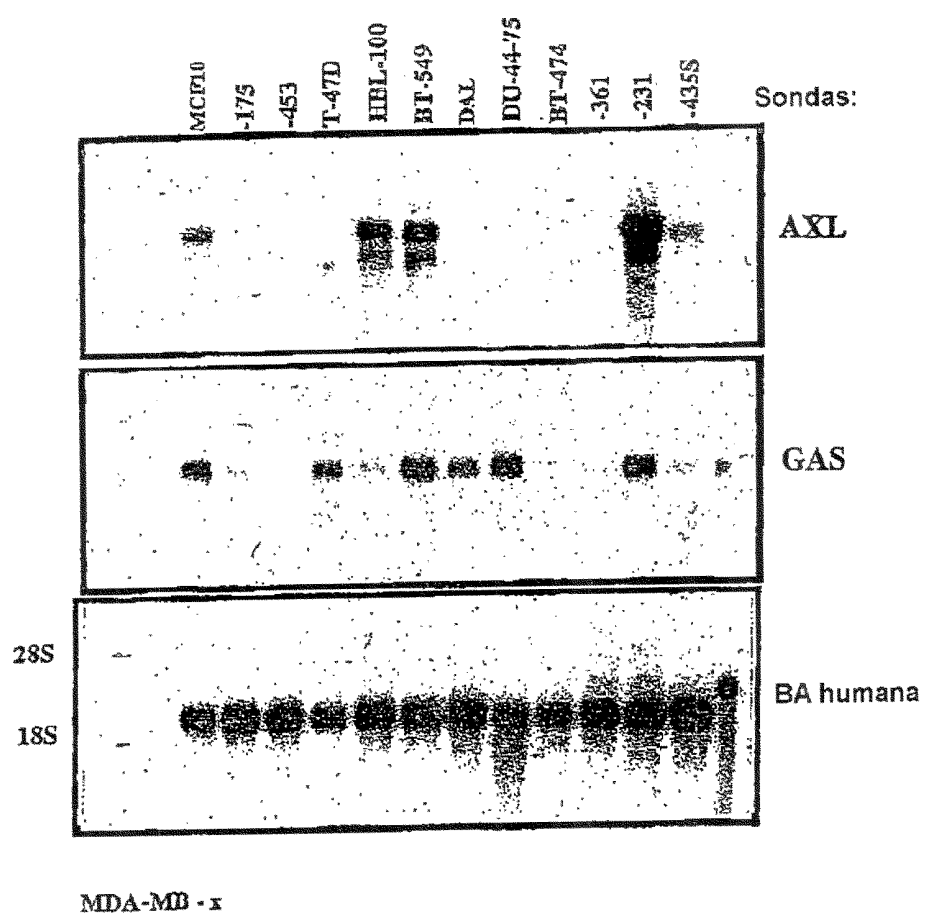


Fig. 4

El crecimiento 3D sobre matriz de Matrigel estirpes celulares de cáncer de mama invasivas diferentes (14 días)

MDA-MB-435S, simulada



BT549, simulada



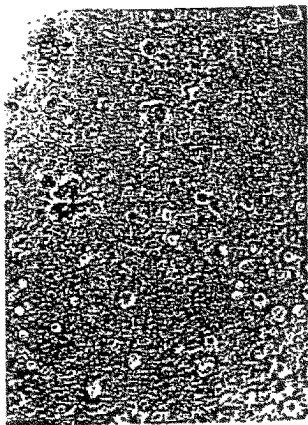
MDA-MB-231, simulada



-dnAXL, clon 2



-dnAXL, clon 7



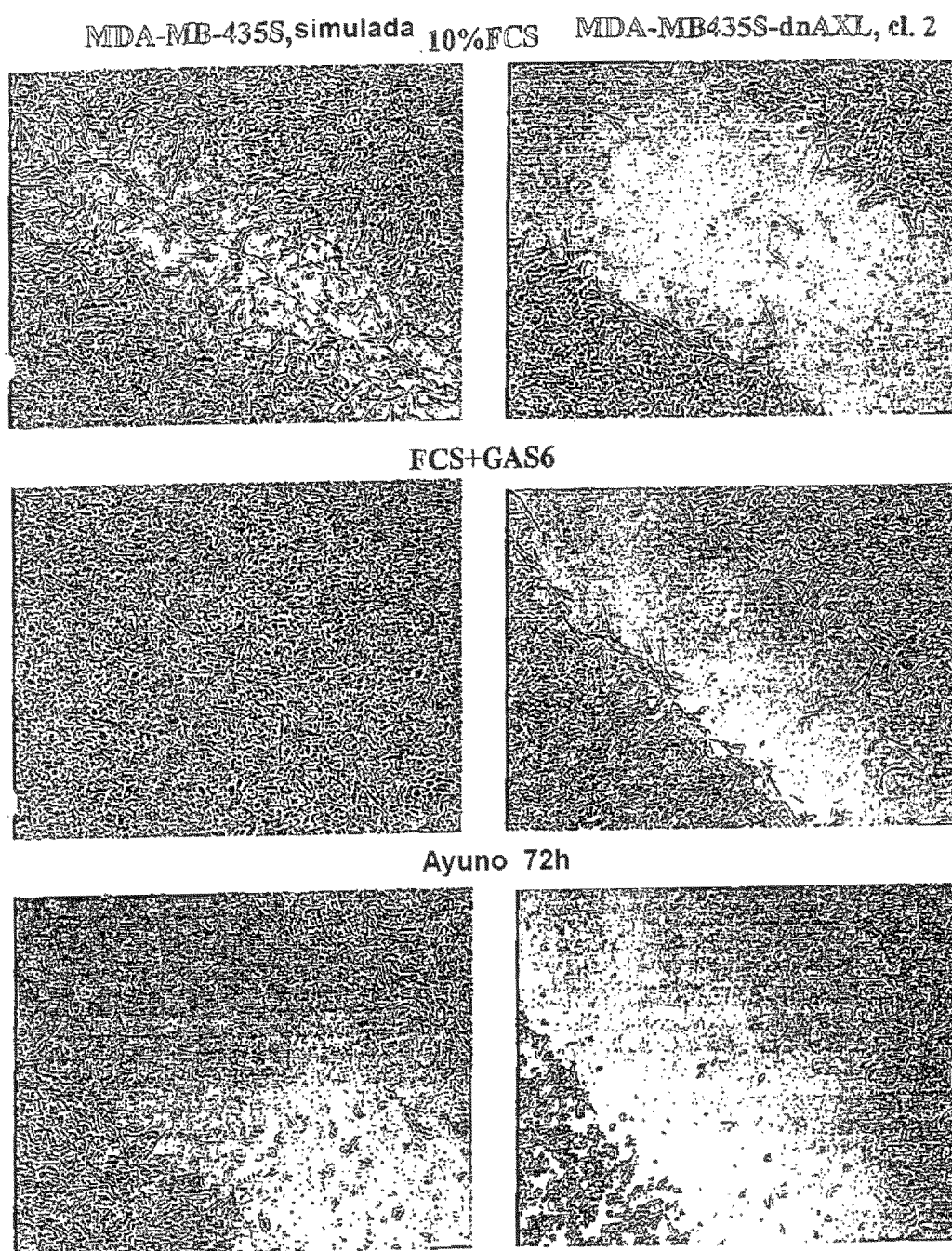
-dnAXL, clon 8



Fig. 5A Todos los clones dn-AXL crecieron como células cancerosas invasivas, fusionadas pseudo-acinares x 100

Fig. 5B

Ensayo de herida



MDA-MB-435S, simuladas tratadas mediante anticuerpo (ab) Ex-AXL: crecimiento 3D en MM, 14 días

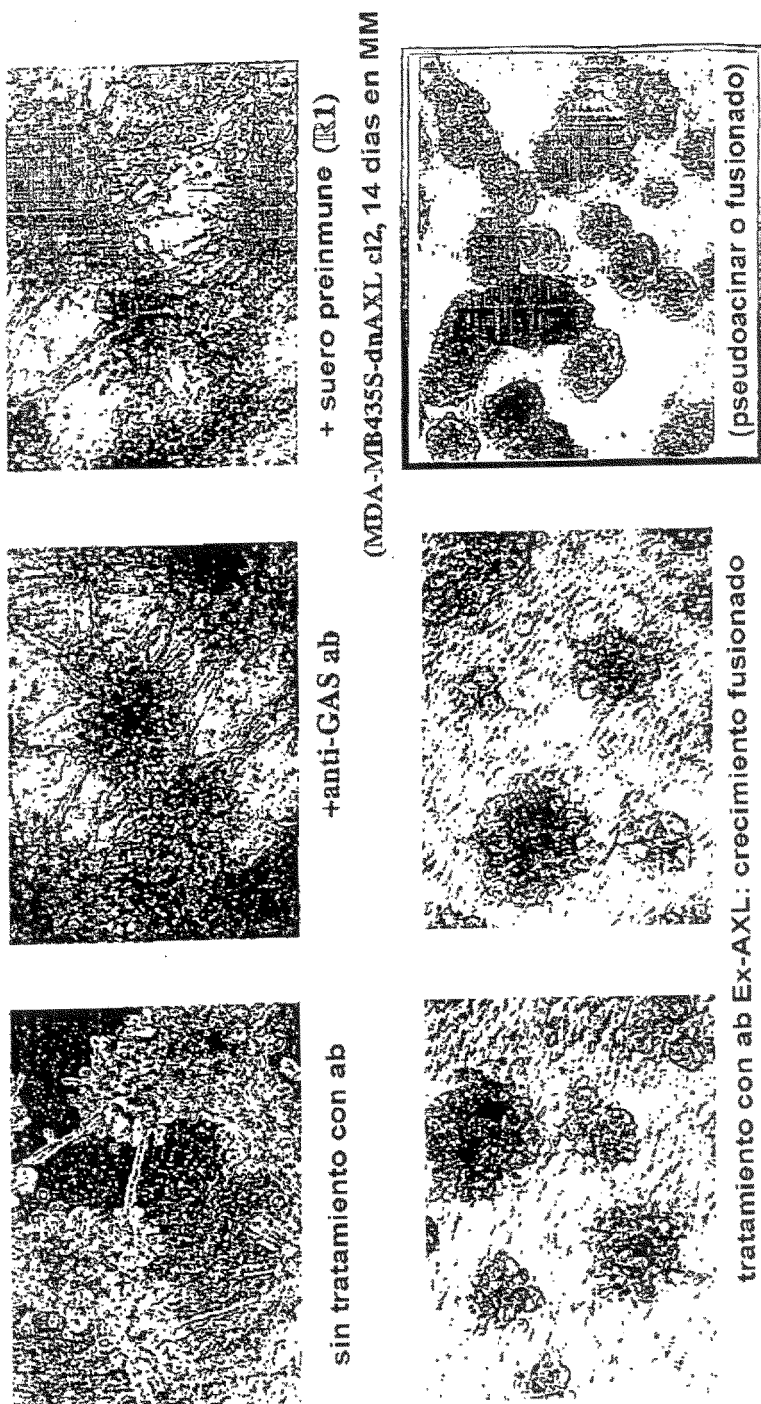


Fig. 6A

todo x100

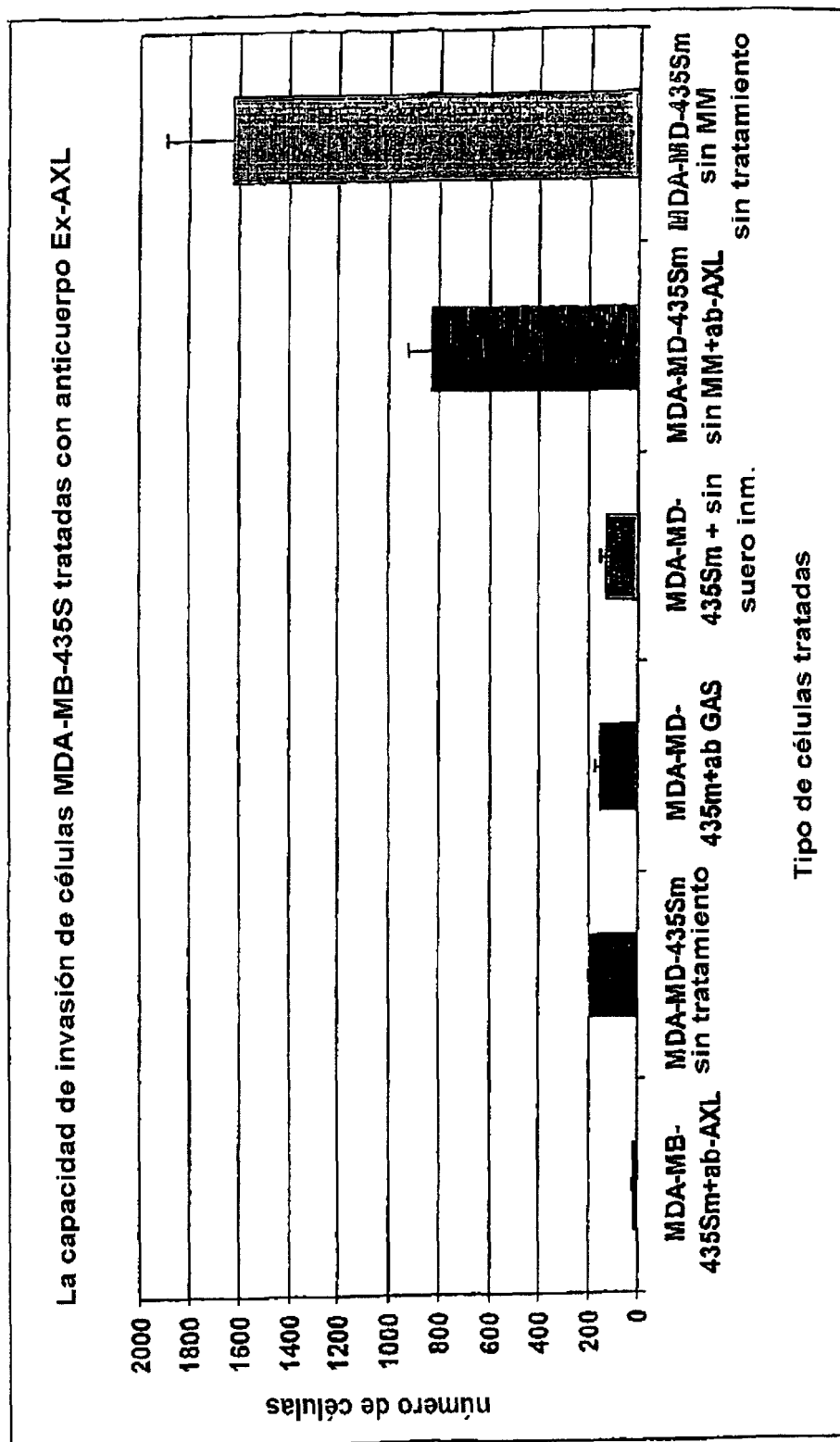


Fig. 6B

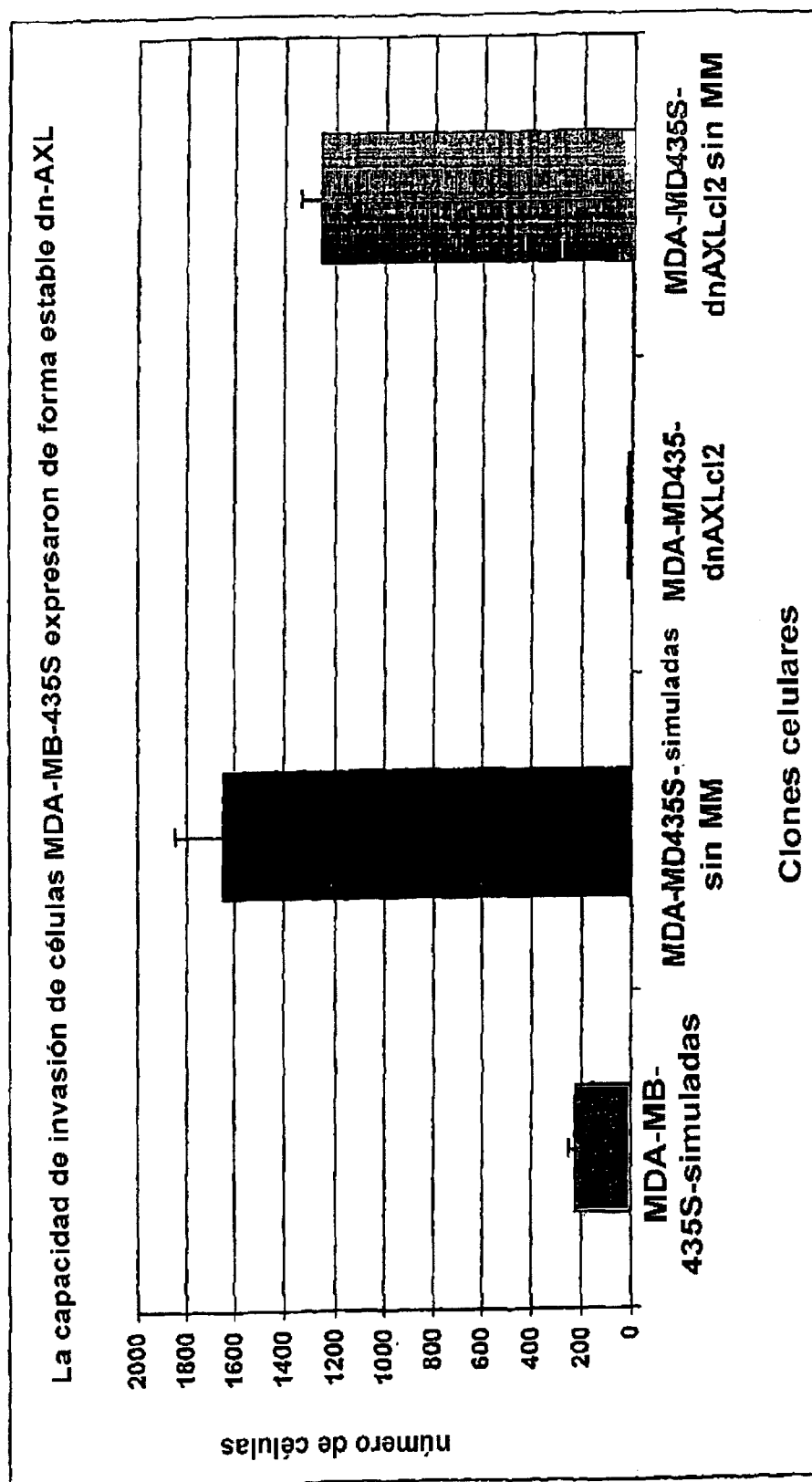


Fig. 6C

La morfología de la estirpe celular de cáncer de mama MCF7 con
sobreexpresión forzada RTK AXL wt

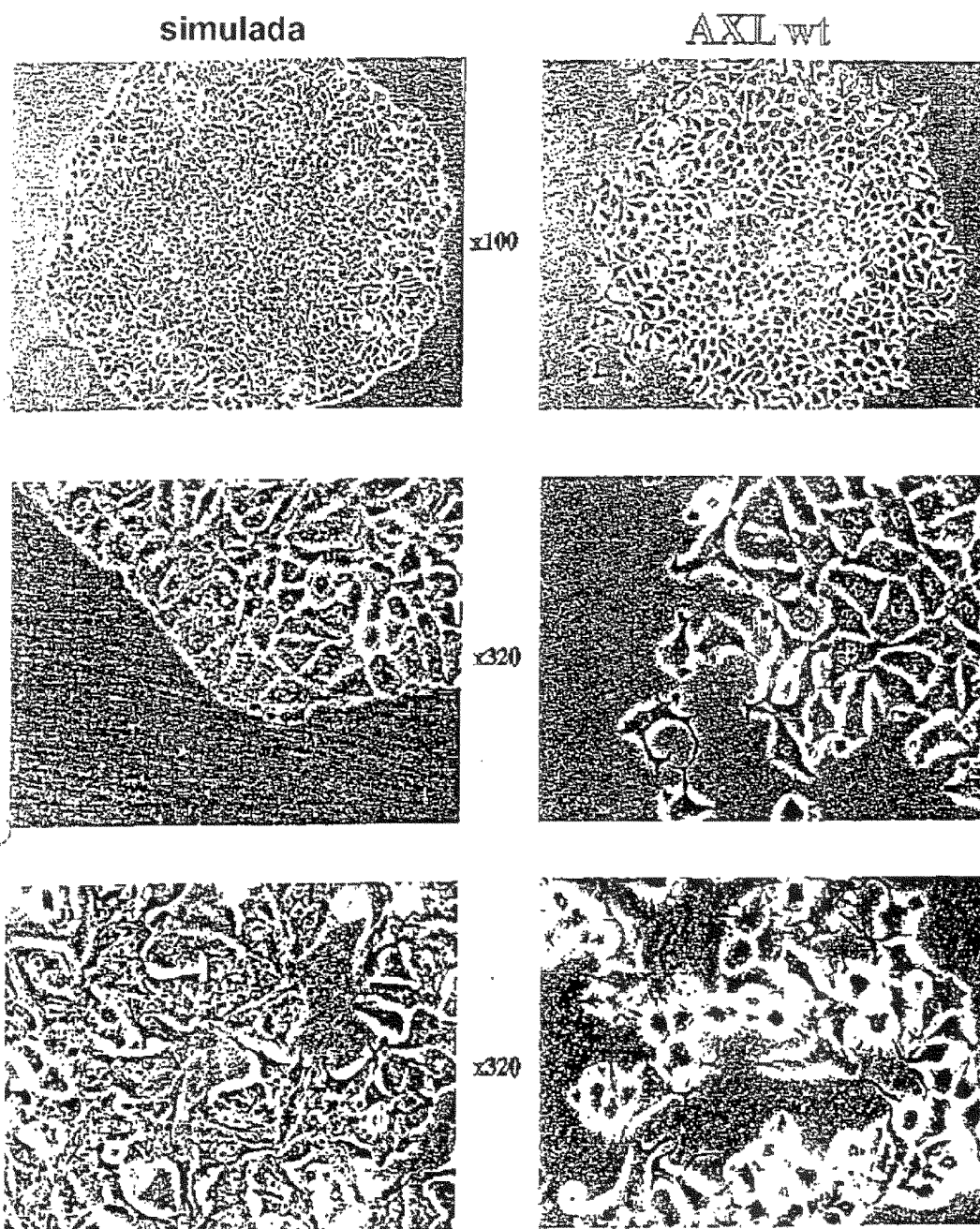


Fig.7A

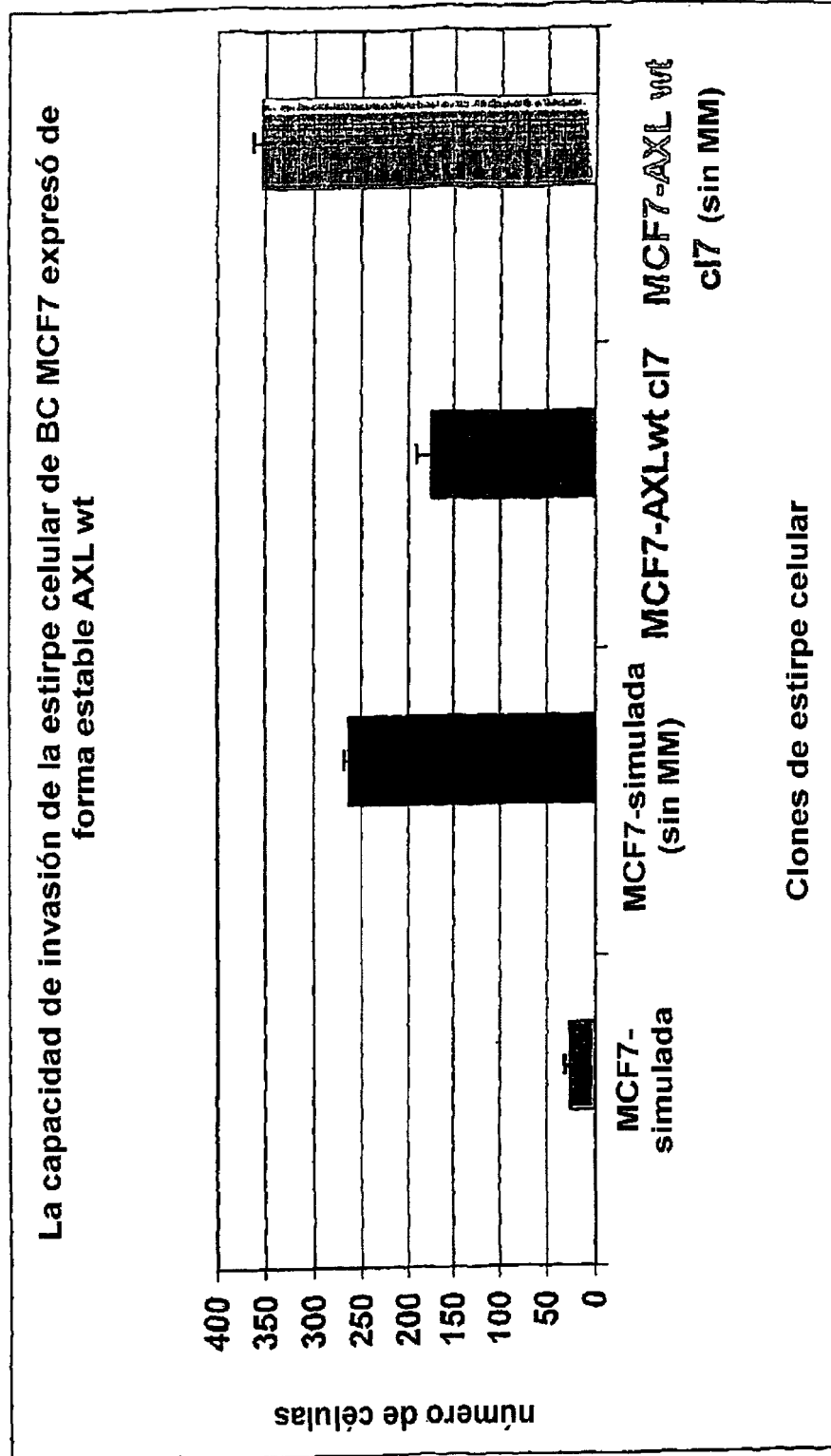


Fig. 7B

Figura 8

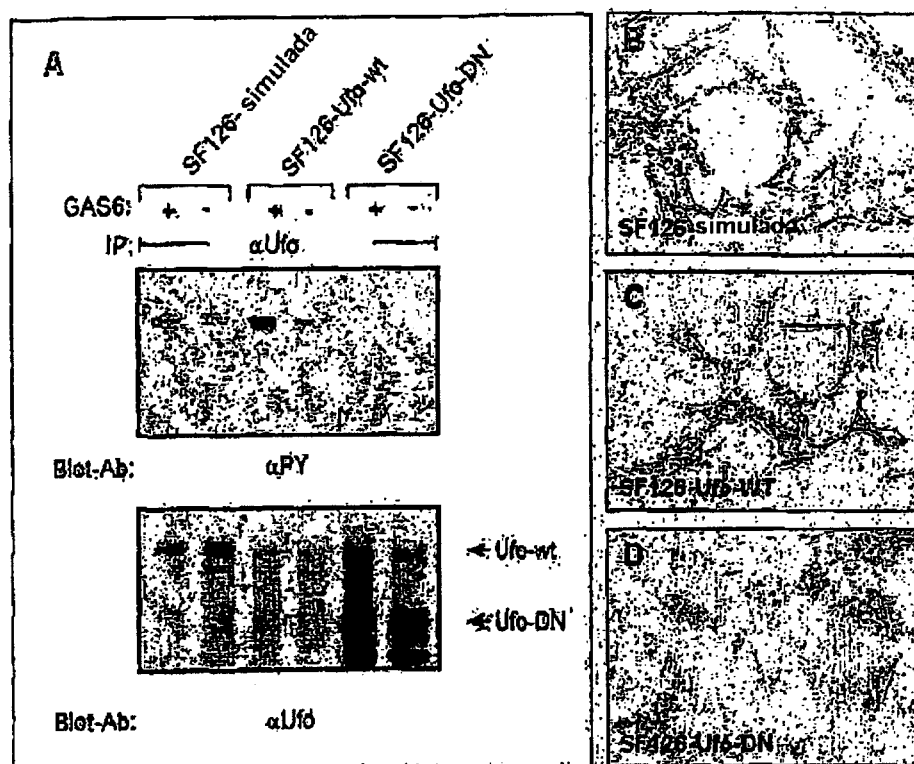


Figura 9

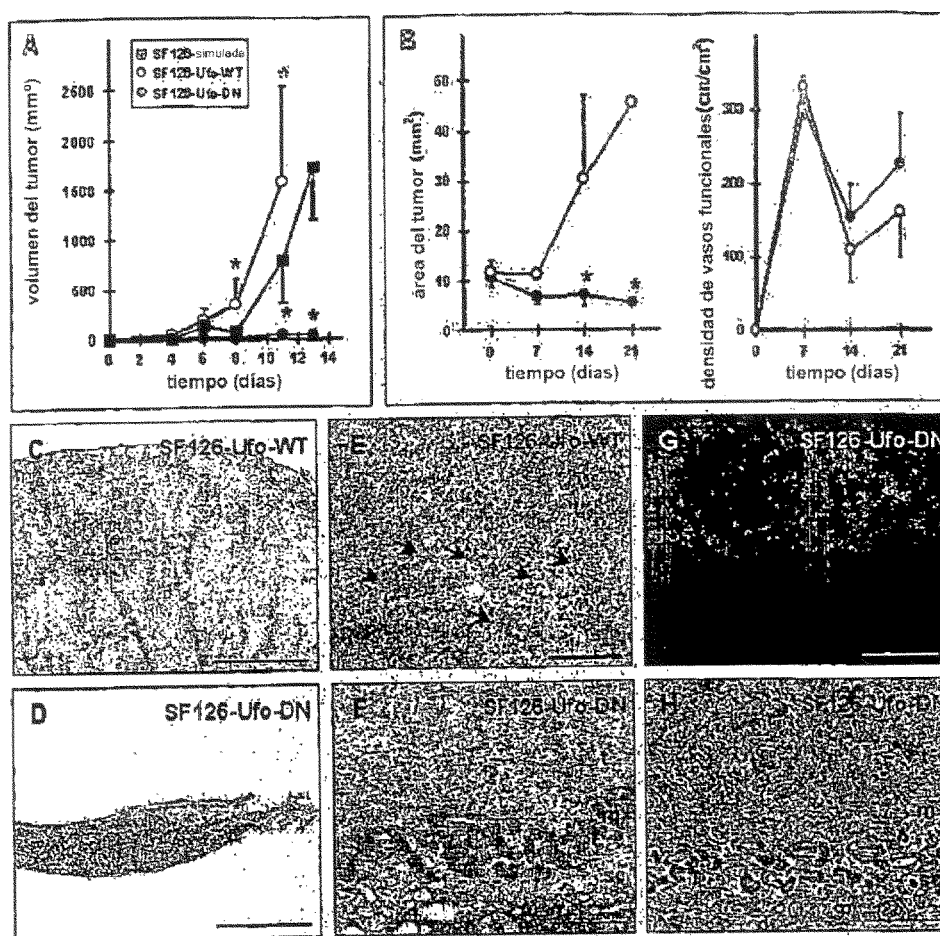


Figura 10

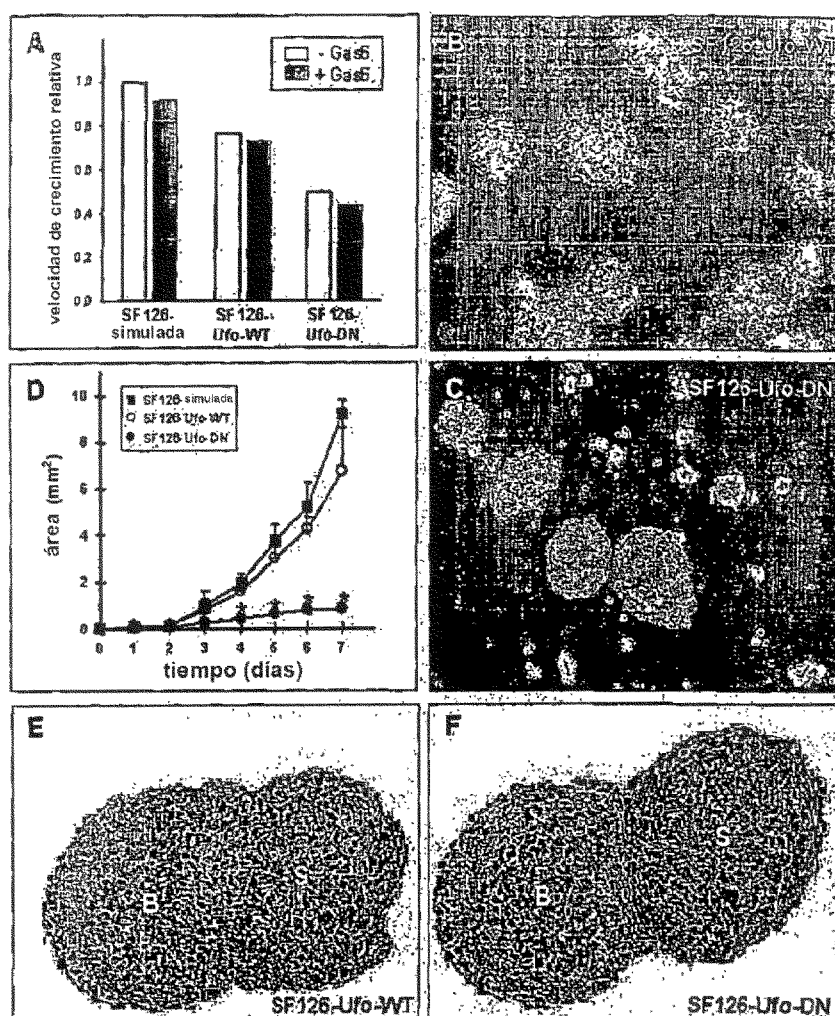


Figura 11

