

**EXPRESSIÓ I FUNCIÓ DEL RECEPTOR  
D'ANDRÒGENS I DE LES SEVES UNITATS DE  
TRANSCRIPCIÓ ALTERNATIVES EN EL  
CÀNCER DE PRÒSTATA I EN LA DIABETIS**

TESI DOCTORAL

ANNA BARBOSA DESONGLES

2013

# ÍNDEX

<b>ABREVIATURES</b>	<b>9</b>
<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	<b>11</b>
<b>1.1. LA PRÒSTATA</b>	<b>13</b>
1.1.1. Funció	13
1.1.2. Histologia	13
1.1.3. Desenvolupament	15
1.1.4. Funció	15
1.1.5. Lesions pròstata	16
1.1.5.1 Prostatitis	16
1.1.5.2 Hiperplàsia Benigna de pròstata (HBP)	16
1.1.5.3 Atròfia inflamativa proliferativa (PIA)	17
1.1.5.4 Neoplasia intraepitelial prostàtica (PIN)	17
<b>1.2. CÀNCER DE PRÒSTATA</b>	<b>18</b>
1.2.1 Generalitats	18
1.2.2 Inici i progressió	18
1.2.3 Detecció	19
1.2.4 Tractament	19
<b>1.3. EL RECEPTOR D'ANDRÒGENS (AR)</b>	<b>21</b>
1.3.1 Introducció	21
1.3.2 El gen d'AR	22
1.3.3 Transcripció del gen d'AR	30
1.3.4 Isoformes d'AR	31
1.3.4.1 Comparació filogenètica d'AR45	33
1.3.5 Acció genòmica dels andrògens	34
1.3.6 Acció no genòmica dels andrògens	35

1.3.7 AR i pròstata	37
1.3.8 AR i càncer de pròstata	37
1.3.8.1 Importància de la fosforilació d'AR en el càncer de pròstata	40
<b>1.4. EPIGENÈTICA</b>	<b>41</b>
1.4.1 Introducció	41
1.4.2 Regulació epigenètica	42
1.4.3 Metilació del DNA	43
1.4.4 Metilació del DNA i càncer	45
1.4.5 Metilació de l'AR i càncer	46
1.4.6 Càncer i tractament epigenètic	47
<b>1.5. LA DIABETIS I EL CÀNCER DE PRÒSTATA</b>	<b>48</b>
<b>1.6. EXISTÈNCIA DE PROMOTORS I DE PRIMERS EXONS ALTERNATIUS EN ELS RECEPTORS NUCLEARS</b>	<b>52</b>
1.6.1 El control de la transcripció	52
1.6.2 Promotors alternatius i el control de l'expressió gènica	53
1.6.2.1 <i>Splicing</i> alternatiu	54
1.6.3 Primers exons alternatius en els receptors nuclears	54
<b>1.7. MODELS CEL·LULARS I ANIMALS</b>	<b>56</b>
1.7.1 Models cel·lulars utilitzats en el càncer de pròstata	56
1.7.2 Models animals utilitzats en el càncer de pròstata	57
1.7.3 Model experimental en la DM2	58
<b>2. HIPÒTESIS I OBJECTIUS</b>	<b>59</b>
<b>3. MATERIALS I MÈTODES</b>	<b>63</b>
<b>3.1. LÍNIES CEL·LULARS</b>	<b>65</b>
3.1.1 Cèl·lules	65
3.1.2 Condicions de cultiu	67
3.1.3 Tractament cel·lular	68
3.1.4 Transfecció transitòria de les línies cel·lulars	71

<b>3.2 MODELS ANIMALS</b>	<b>71</b>
3.2.1 Model animal PAC120	71
3.2.2 Trasplantament del tumor	74
3.2.3 Tractaments	75
3.2.3.1 Castració química	75
3.2.3.2 Tractament amb 5-aza-2'-deoxicitidina (5-AZA)	77
3.2.3.3 Inducció de la diabetis amb estreptozotocina (STZ)	77
<b>3.3 PURIFICACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS</b>	<b>78</b>
3.3.1 Extracció de RNA total	78
3.3.1.1 Extracció de RNA de línies cel·lulars	78
3.3.1.2 Extracció de RNA de teixits	79
3.3.2 Purificació de DNA plasmídic	80
3.3.2.1 Purificació a petita escala de DNA plasmídic	80
3.3.2.2 Purificació a gran escala del DNA plasmídic	80
3.3.3 Purificació d'àcids nucleics a partir dels gels d'agarosa	81
3.3.4 Purificació dels productes de PCR semiquantitativa	81
<b>3.4 ANÀLISI D'ÀCIDS NUCLEICS</b>	<b>81</b>
3.4.1 Amplificació d'àcids nucleics	81
3.4.2 Retrotranscripció (RT)	82
3.4.3 Disseny dels encebadors	82
3.4.4 PCR	83
3.4.5 PCR quantitativa a temps real (qPCR)	84
3.4.5.1 Anàlisi de les dades obtingudes mitjançant qPCR	86

<b>3.5 ANÀLISI DELS EXTREMS 5' i 3' D'AR</b>	<b>87</b>
3.5.1 5'RNA <i>Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends</i> (5'RLM-RACE)	87
3.5.2 3' <i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i> (3'RACE)	91
<b>3.6 MECANISME DE SILENCIAMENT GÈNIC: EL siRNA</b>	<b>93</b>
3.6.1 Principis generals	93
3.6.2 Protocol	93
<b>3.7 MUTAGÈNESI DIRIGIDA</b>	<b>94</b>
<b>3.8 ANÀLISI DE LA METILACIÓ DEL DNA</b>	<b>95</b>
3.8.1 Extracció de DNA	95
3.8.2 Conversió del DNA	96
3.8.3 PCR de metilació	97
<b>3.9 Seqüenciació del DNA</b>	<b>98</b>
<b>3.10 DNA recombinant</b>	<b>99</b>
3.10.1 Clonatge i subclonatge de DNA	99
3.10.1.1 Clonatge de productes de PCR	99
3.10.1.2 Subclonatge de DNA	100
<b>3.11 BACTERIS COMPETENTS</b>	<b>103</b>
3.11.1 Preparació de bacteris competents per transformar per xoc tèrmic	103
3.11.2 Transformació per xoc tèrmic	103
<b>3.12 VECTORS I CONSTRUCCIONS</b>	<b>105</b>
3.12.1 Vectors	105
3.12.2 Construccions	106

<b>3.13 EXTRACCIÓ DE PROTEÏNA</b>	<b>106</b>
3.13.1 Extracció total de proteïna	106
3.13.2 Separació fraccions cel·lulars	107
3.13.3 Quantificació	108
<b>3.14 ANÀLISI DE LES PROTEÏNES MITJANÇANT ELECTROFORESI EN GELS DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) I WESTERN BLOT (WB)</b>	<b>108</b>
3.14.1 Electroforesi SDS-PAGE	109
3.14.2 <i>Western blot (WB)</i>	111
<b>3.15 ANTICOSSOS PRIMARIS</b>	<b>112</b>
<b>3.16 ANTICOSSOS SECUNDARIS</b>	<b>113</b>
<b>3.17 REVELAT</b>	<b>113</b>
<b>3.18 IMMUNOPRECIPITACIÓ (IP)</b>	<b>114</b>
<b>3.19 IMMUNOFLUORESCÈNCIA</b>	<b>116</b>
3.19.1 Immunocitofluorescència	117
3.19.2 Immunohistofluorescència	118
3.19.3 Immunohistoquímica	119
<b>3.20 ANÀLISI MORFOLÒGIC: TINCIÓ HEMATOXILINA I EOSINA</b>	<b>119</b>
<b>3.21 ANÀLISI ESTADÍSTICA</b>	<b>120</b>
<b>3.22 BIOINFORMÀTICA</b>	<b>121</b>
<b>4. RESULTATS</b>	<b>123</b>
<b>4.1 CARACTERITZACIÓ I EXPRESSIÓ DE LES ISOFORMES DE mRNA D'AR EN TEIXITS I LÍNIES CEL·LULARS DE CÀNCER DE PRÒSTATA</b>	<b>125</b>
4.1.1 Anàlisi de l'expressió d'AR en línies cel·lulars	125
4.1.2 Estudi de la seqüència 5' de la isoforma 1B d'AR	126

4.1.3 Realització del 5'RLM-RACE	127
4.1.4 Caracterització dels nous exons alternatius d'AR en l'extrem 5'	131
4.1.4.1 Exó 1C	133
4.1.4.2 Exó 1D	134
4.1.4.3 Exó 1E	135
4.1.5 Comparació filogenètica dels primers exons alternatius d'AR	145
4.1.6 Identificació de les unitats de transcripció d'AR en línies prostàtiques, no prostàtiques i teixits mitjançant PCR semiquantitativa	150
4.1.7 Anàlisi de l'expressió de les isoformes d'AR en les línies cel·lulars de càncer de pròstata mitjançant PCR quantitativa	155
4.1.8 Anàlisi de l'estabilitat del RNA de les isoformes d'AR	157
4.1.9 Estudis de la traducció de les isoformes d'AR	159
4.1.10 Identificació de possibles nous exons alternatius en l'extrem 3' utilitzant la tècnica del 3' RACE	163
<b>4.2 ANÀLISI DELS NIVELLS DE mRNA DE L'AR EN LA LÍNIA CEL·LULAR LNCaP EN CONDICIONS DE DEPRIVACIÓ HORMONAL</b>	<b>165</b>
4.2.1 Detecció de la disminució del marcatge d'AR per la supressió hormonal de les cèl·lules	168
4.2.2 Anàlisi de la metilació del promotor d'AR en les LNCaP deprivades d'hormones.	169
4.2.3 Anàlisi dels llocs d'unió dels factors de transcripció del promotor 1A d'AR	170
<b>4.3 ANÀLISI DEL CREIXEMENT DEL TUMOR DE PRÒSTATA EN EL MODEL ANIMAL PAC120 EN ELS DIFERENTS TRACTAMENTS</b>	<b>171</b>
<b>4.4 ANÀLISI DELS NIVELLS DE mRNA I DE PROTEÏNA D'AR EN EL MODEL ANIMAL PAC120 EN CONDICIONS DE DEPRIVACIÓ HORMONAL</b>	<b>177</b>

<b>4.5 DETERMINACIÓ DE L'EXPRESSION DE LA PROTEÏNA D'AR EN EL MODEL ANIMAL PAC120 I ESTUDI HISTOLÒGIC DEL TUMOR</b>	<b>182</b>
<b>4.6 ANÀLISI DE LA METILACIÓ DEL PROMOTOR D'AR EN ELS TUMORS DEL PAC120 TRACTATS AMB FE200486</b>	<b>185</b>
<b>4.7 ANÀLISI DE LA LOCALITZACIÓ CEL·LULAR D'AR EN LNCaP</b>	<b>188</b>
4.7.1 AR es localitza a la mitocondria en línies de càncer de pròstata hormono-independents.	189
4.7.2 La localització mitocondrial d'AR augmenta en LNCaP deprivades d'hormones.	191
<b>4.8 LOCALITZACIÓ MITOCONDRIAL DE L'AR EN TUMORS PAC120 CASTRATS</b>	<b>192</b>
<b>4.9 ANÀLISI <i>IN SILICO</i> D'AR PER DETERMINAR LA PRESÈNCIA DE SENYALS DE LOCALITZACIÓ MITOCONDRIALS</b>	<b>193</b>
<b>4.10 L'AR INTERACCIONA AMB LA SUBUNITAT IV DEL COMPLEX IV</b>	<b>194</b>
<b>4.11 L'ANÀLISI DEL GENOMA MITOCONDRIAL HUMÀ MOSTRA POSSIBLES LLOCS D'UNIÓ I D'ACCIÓ DE LES HORMONES ESTEROÏDALS</b>	<b>196</b>
<b>4.12 EL TRACTAMENT AMB INSULINA NO AFECTA ELS NIVELLS D'AR EN LES LNCaP</b>	<b>197</b>
<b>4.13 L'AUGMENT DE CONCENTRACIÓ DE GLUCOSA DISMINUEIX EL NIVELL D'AR EN LNCaP</b>	<b>199</b>
<b>4.14 DETECCIÓ DE LA DISMINUCIÓ DEL MARCATGE NUCLEAR D'AR EN AUGMENTAR LA CONCENTRACIÓ DE GLUCOSA</b>	<b>201</b>
<b>4.15 EL TRACTAMENT AMB DIFERENTS CONCENTRACIONS DE GLUCOSA NO VARIA LA MORFOLOGIA DE LES LNCaP</b>	<b>203</b>
<b>4.16 SINÈRGIA D'ALTES CONCENTRACIONS DE GLUCOSA I TNF-<math>\alpha</math> EN LA DISMINUCIÓ DE L'EXPRESSION D'AR EN LA LÍNIA CEL·LULAR LNCaP</b>	<b>204</b>
<b>4.17 LA HIPERGLICÈMIA REDUEIX ELS NIVELLS D'AR A TRAVÉS DE L'ACTIVACIÓ DE NF-<math>\kappa</math>B EN LES LNCaP</b>	<b>206</b>



<b>4.18 EL TRACTAMENT AMB STZ I CITRAT NO ÉS TÒXIC EN LES CÈL·LULES</b>	
<b>EPITELIALS LNCaP</b>	<b>208</b>
4.18.1 No canvia la morfologia ni el nombre cel·lular	208
4.18.2 No disminueix els nivells de mRNA de l'AR	209
<b>4.19 LA DIABETIS INDUÏDA AMB STZ PRODUÏX UN RETARD EN EL</b>	
<b>CREIXEMENT DEL TUMOR DE PRÒSTATA EN EL MODEL ANIMAL PAC120</b>	<b>209</b>
<b>4.20 LA DIABETIS INDUÏDA PER STZ PRODUÏX UNA REDUCCIÓ DEL MARCATGE</b>	
<b>DE L'AR EN ELS TUMORS I EN LES PRÒSTATES ENDÒGENES</b>	<b>211</b>
<b>4.21 LA DIABETIS INDUÏDA PER STZ PRODUÏX NECROSI EN EL TUMOR</b>	<b>214</b>
<b>4.22 LA DIABETIS INDUÏDA PER STZ PRODUÏX UNA REDUCCIÓ DEL NIVELL DE</b>	
<b>mRNA D'AR I PSA EN ELS TUMORS D'ANIMALS DIABÈTICS</b>	<b>215</b>
<b>4.23 LA HIPERGLICÈMIA REDUEIX ELS NIVELLS D'AR A TRAVÉS DE L'ACTIVACIÓ</b>	
<b>DE NF-<math>\kappa</math>B EN EL MODEL ANIMAL</b>	<b>216</b>
<b>5. DISCUSSIÓ</b>	<b>219</b>
<b>5.1 ISOFORMES D'AR</b>	<b>221</b>
<b>5.2 NIVELLS D'AR</b>	<b>231</b>
<b>5.3 EFECTES DE LA DEPRIVACIÓ ANDROGÈNICA EN EL CREIXEMENT TUMORAL</b>	<b>233</b>
<b>5.4 MORFOLOGIA TUMORAL</b>	<b>237</b>
<b>5.5 METILACIÓ</b>	<b>238</b>
<b>5.6 LOCALITZACIÓ D'AR A LA MITOCÒNDRIA</b>	<b>241</b>
<b>5.7 PAPER DE LA HIPERGLICÈMIA I EL TNF<math>\alpha</math> EN EL CÀNCER DE PRÒSTATA</b>	<b>247</b>
<b>6. CONCLUSIONS</b>	<b>259</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>265</b>

## ABREVIATURES

<b>3' ss</b>	<i>3' splice site</i>	<b>mL</b>	Mil·lilitre
<b>5' o 3'UTR</b>	<i>5' o 3' untranslated region</i>	<b>mM</b>	Milimolar
<b>5' o 3'UTR</b>	<i>5' o 3' untranslated region</i>	<b>MR</b>	Receptor de mineralocorticoides
<b>5'ss</b>	<i>5' splice site</i>	<b>mRNA</b>	RNA missatger
<b>5-AZA</b>	5-aza-2'-deoxicitidina	<b>NES</b>	Seqüència exportació nuclear
<b>5<math>\alpha</math>-DHT</b>	5 $\alpha$ -Dihidrotestosterona	<b>NK-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear I $\kappa$ B
<b>AF1/2</b>	Funció de transactivació 1 / 2	<b>NLS</b>	Seqüència localització nuclear
<b>AR</b>	Receptor d'andrògens	<b>Nt</b>	Nucleòtid
<b>ARE</b>	<i>Androgen response elements</i>	<b>NTD</b>	Domini N-terminal
<b>AS</b>	<i>Alternative splicing</i>	<b>o/n</b>	<i>Over night</i>
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>	<b>ORF</b>	<i>Open reading frame</i>
<b>BLAST</b>	<i>Basic local alignment and search tool</i>	<b>PA</b>	Promotors alternatius
<b>BSA</b>	Sèrum d'albúmina boví	<b>PAC120</b>	<i>Prostate AdenoCarcinoma 120</i>
<b>BSP</b>	<i>Bisulphite-specific PCR</i>	<b>PAP</b>	Fosfatasa àcida prostàtica
<b>cDNA</b>	Àcid desoxiribonucleic complementari	<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>CpG</b>	Citosina precedint guanina	<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>CRPC</b>	Càncer de pròstata resistent a la castració	<b>PIA</b>	Atròfia inflamatòria proliferativa
<b>CS-FBS</b>	<i>Charcoal-stripped FBS</i>	<b>PIN</b>	Neoplàsia benigna de pròstata
<b>CTD</b>	Domini C-terminal	<b>PKA</b>	Proteïna kinasa A
<b>DBD</b>	<i>DNA binding domain</i>	<b>PKC</b>	Proteïna kinasa C
<b>DMEM</b>	<i>Dubelco's modified Eagle's medium</i>	<b>PR</b>	Receptor de progesterona
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfòxid	<b>PSA</b>	Antigen específic de la pròstata
<b>DNA</b>	Àcid desoxiribonucleic	<b>QNZ</b>	N4-[2-(4-fenoxifenil)etil]-4,6 quinazolinediamina
<b>DNMT</b>	DNA metiltransferases	<b>RACE</b>	<i>Rapid amplification of cDNA ends</i>
<b>dNTPs</b>	<i>deoxyribonucleoside triphosphates</i>	<b>RN</b>	Receptors nuclears
<b>EGF</b>	<i>Epidermal growth factor</i>	<b>RNA</b>	Àcid ribonucleic
<b>ER</b>	Receptor d'estrògens	<b>rpm</b>	Revolucions per minut
<b>FBS</b>	Sèrum fetal boví	<b>shRNAs</b>	<i>Short hairpin RNAs</i>
<b>g</b>	Gravetats	<b>siRNAs</b>	<i>Small interference RNAs</i>
<b>GR</b>	Receptor de glucocorticoides	<b>SOC</b>	Medi enriquít
<b>h</b>	Hora	<b>Sp-1</b>	Factor de transcripció
<b>HBP</b>	Hiperplàsia benigna de pròstata	<b>SPF</b>	<i>Single pathogen free</i>
<b>HDAC</b>	Histona deacetilasa	<b>STZ</b>	Estreptozotocina
<b>HRE</b>	<i>Hormone response elements</i>	<b>T</b>	Testosterona
<b>HSP</b>	<i>Heat shock proteins</i>	<b>TA</b>	Temperatura ambient
<b>Inr</b>	Seqüència <i>Initiator</i>	<b>TAF</b>	<i>TBP associated factors</i>
<b>Kb</b>	Kilobase	<b>TAU-1/5</b>	Unitat d'activació transcripcional
<b>KDa</b>	kiloDalton	<b>TBP</b>	<i>TATA binding protein</i>
<b>LB</b>	Luria-Bertani broth	<b>TF</b>	Factor de transcripció
<b>LBD</b>	<i>Ligand binding domain</i>	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<i>Tumour necrosis factor <math>\alpha</math></i>
<b>LBP</b>	<i>Ligand binding protein</i>	<b>TSS</b>	Lloc d'inici de la transcripció
<b>MAPK</b>	Proteïna kinasa activadora de la mitosi	<b>uATG</b>	<i>Upstream ATG</i>
<b>min</b>	Minuts	<b>uORF</b>	<i>Upstream ORF</i>
<b>miRNAs</b>	microRNAs	<b>VDAC</b>	<i>Voltage-dependent anion channels</i>



# 1. INTRODUCCIÓ

---



## **1.1 LA PRÒSTATA**

### **1.1.1 Introducció**

La pròstata (del greck προστάτης – pròstata, literalment significa el qui està abans, protector, guardià) és una glàndula exocrina de la mida d'una nou que forma part del sistema reproductor masculí en mamífers. En l'home adult té tres centímetres de longitud i pesa al voltant de 20 grams. Es localitza a la pelvis, per sota de la bufeta de l'orina i en front del recte. La pròstata rodeja la uretra proximal, el tub que transporta l'orina des de la bufeta a l'exterior en la micció, i el semen durant l'ejaculació. Degut a la seva localització, moltes vegades les malalties prostàtiques afecten a la micció, l'ejaculació i rares vegades a la defecació.

### **1.1.2 Histologia**

L'estructura anatòmica de la pròstata va ser descrita per Salvador Gil Vernet (Gil Vernet 1955) i posteriorment reconfirmada per McNeal (McNeal 1968). Anatòmicament s'hi poden distingir tres zones: la zona perifèrica, la zona central i la zona de transició.

La zona perifèrica és la més extensa de la pròstata i representa el 70% del teixit prostàtic. Està formada per acins petits disposats de manera regular i separats per fines trabècules de teixit fibromuscular. És en aquesta zona on es desenvolupen el 70% dels tumors de pròstata.

La zona central constitueix el 25% de la massa glandular prostàtica i està formada per acins grans i disposats de manera irregular, separats per trabècules gruixudes de teixit fibromuscular. Aquesta zona és la que envolta els conductes ejaculadors. Les glàndules epitelials d'aquesta zona presenten característiques morfològiques i histològiques diferents a les glàndules d'altres regions de la pròstata. Generalment en aquesta zona no es desenvolupa el tumor prostàtic.

La zona de transició constitueix el 5% del teixit glandular prostàtic i està formada per un conjunt de conductes. El volum d'aquesta zona augmenta considerablement amb l'edat, en sentit anteroposterior més que en sentit longitudinal. Presenta similitud histològica amb la

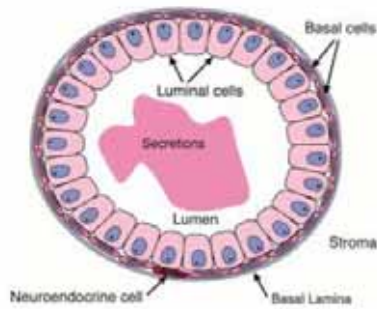
zona perifèrica. En la zona de transició s'origina la hiperplàsia benigna de pròstata (HBP) i s'hi desenvolupen el 20% dels carcinomes prostàtics.

La pròstata madura conté 5 tipus cel·lulars interrelacionats entre ells per formar la glàndula prostàtica: cèl·lules epitelials luminals secretores, cèl·lules epitelials basals, cèl·lules neuroendocrines, cèl·lules intermediàries i cèl·lules mare (figura 1).

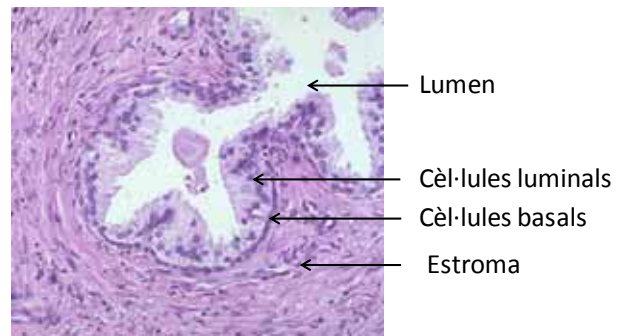
1. El compartiment exocrí de la pròstata està format per cèl·lules epitelials luminals que secreten l'antigen específic prostàtic o *prostate specific antigen* (PSA) i la fosfatassa àcida alcalina (PAP) al lumen. Les cèl·lules secretores expressen el receptor d'andrògens (AR).
2. Les cèl·lules epitelials basals formen una única capa a la membrana basal envoltant l'epiteli prostàtic de cada glàndula. Són cèl·lules indiferenciades i formen el compartiment proliferatiu de la pròstata. No expressen l'AR i manquen d'activitat secretora.
3. Les cèl·lules neuroendocrines són un percentatge petit de l'epiteli prostàtic. Aquestes cèl·lules secreten pèptids que contribueixen al creixement o diferenciació de les cèl·lules epitelials del voltant.
4. Les cèl·lules intermediàries expressen caràcters de les cèl·lules basals i/o de les neuroendocrines. S'ha proposat que aquestes cèl·lules proliferatives siguin *stem-like cells* o cèl·lules progenitores en procés de transició cap a cèl·lules secretores.
5. Les cèl·lules mare es troben en la capa basal epitelial de la glàndula.

Els acins i conductes prostàtics estan immersos en una matriu estromal formada per teixit fibromuscular, muscular i connectiu (component no glandular de la pròstata). Hi trobarem dos tipus cel·lulars: els miofibroblasts (expressen vimentina i desmina) i les cèl·lules musculars llises (expressen miosina i desmina). Aquests tipus cel·lulars guien el creixement i la diferenciació cel·lular de l'epiteli. Cèl·lules sanguínies, nervis i cèl·lules endotelials vasculars també formen part de la glàndula (De Marzo, Platz et al. 2007).

A



B



**Figura 1.** Glàndula prostàtica. **A)** Esquema d'una glàndula prostàtica on es poden apreciar els diferents tipus cel·lulars en el conducte prostàtic humà. Les cèl·lules endocrines són indistingibles morfològicament a les cèl·lules basals. **B)** Tinció amb hematoxilina i eosina del teixit prostàtic normal (x200). Les cèl·lules epitelials es disposen formant glàndules, a l'interior de les quals hi ha el lumen. Les glàndules estan immerses en una matriu no epitelial o estroma. Extret de Abate-Shen, *Genes Dev.*2000.

### 1.1.3 Desenvolupament

La pròstata s'origina a partir del mesènquima situat a la part inferior i posterior del sinus urogenital gràcies a l'estimulació dels andrògens. Alhora, aquest mesènquima envolta el conducte de Wolf; la zona mesenquimal situada a la part posterior d'aquest conducte origina la pròstata cranial o zona de transició. Per contra, la zona inferior origina la zona caudal prostàtica o zona perifèrica. Es creu que la zona central s'origina en el conducte de Wolf.

### 1.1.4 Funció

La funció d'aquest òrgan glandular és la síntesi i l'acumulació del fluid prostàtic (líquid de poca densitat compost, entre d'altres, per citrat, calci, fosfat, enzims proteolítics, la fosfatasa àcida i el PSA) que constitueix el 30% del semen, que serà expulsat en el moment de l'ejaculació, gràcies a la musculatura llisa que presenta l'òrgan (Reese, McNeal et al. 1986; Reese, McNeal et al. 1988). Aquest fluid prostàtic és sintetitzat per les cèl·lules secretores dels acins i els conductes de la regió glandular, i nodreix i ofereix protecció als espermatozoides (Guyton and Hall, 1996).



### **1.1.5 Lesions de la pròstata**

Entre les lesions de pròstata trobem la prostatitis, la hiperplàsia benigna de pròstata (HBP), l'atròfia inflamativa proliferativa (PIA), la neoplàsia intraepitelial prostàtica (PIN) (Chodak 2006; Hsing and Chokkalingam 2006) i el tumor de pròstata. Aquest últim és objecte d'estudi d'aquesta tesi i se li dedica un capítol a part (apartat 1.2).

Si tenim en compte la incidència, la principal alteració prostàtica és la HBP, però si tenim en compte la mortalitat, la principal alteració és el càncer de pròstata. Aquest últim és una de les 5 neoplàsies més freqüents en la població (Chodak 2006). L'augment de la incidència és degut a l'augment de la longevitat masculina i al diagnòstic precoç. La seva etiologia no és clara, però sembla ser que hi ha un conjunt de probables factors de risc, com per exemple, l'edat de l'individu, la producció i el metabolisme dels andrògens i la història familiar, entre d'altres.

#### **1.1.5.1. Prostatitis**

És el terme més usat per descriure la inflamació de la pròstata associada a diferents símptomes del tracte urinari, disfuncions i molèsties sexuals. Aquesta patologia afecta entre el 5 i el 10% de la població masculina i és el diagnòstic urològic més comú en homes amb edat inferior als 50 anys. Hi ha 4 categories de prostatitis: la forma bacteriana aguda, la forma crònica, la forma no bacteriana crònica i la forma assintomàtica (Nickel JC, 2007:chap 9) (figura 2A).

#### **1.1.5.2. Hiperplàsia Benigna de pròstata (HBP)**

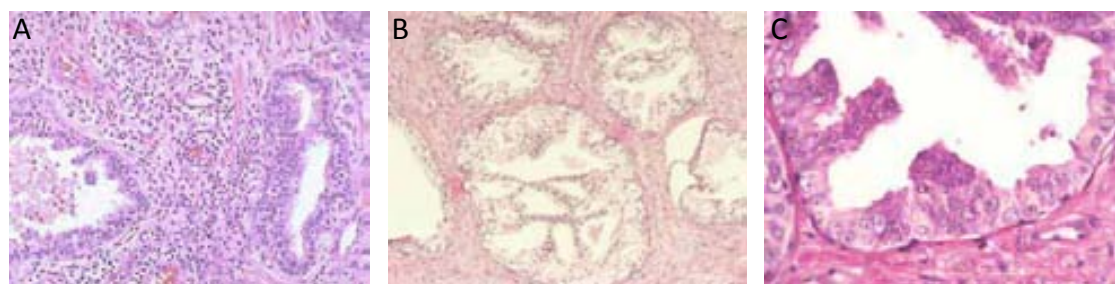
La HBP és un engrandiment de la pròstata no cancerós degut a un excés de glàndules i estroma que afecta la zona de transició de la pròstata. Aquest augment de la mida de la pròstata comprimeix la uretra i interfereix en el flux normal de l'orina. Per això la simptomatologia associada és l'augment de la freqüència i de la dificultat en la micció, el risc d'infeccions del tracte urinari i la retenció d'orina. Els nivells de PSA estan elevats degut al volum i la inflamació, però aquesta lesió no es considera precursora del carcinoma prostàtic. Un 42% dels homes entre els 51 i els 60 anys i el 80% entre els 70 i els 80 anys presenten evidències histològiques de patir aquesta lesió (Barry MJ, 2007:chap 130) (figura 2B).

### 1.1.5.3. Atròfia inflamativa proliferativa (PIA)

La PIA pot ser un precursor primerenc del carcinoma prostàtic. En la PIA existeix un focus d'epiteli glandular proliferatiu amb aparença morfològica d'atròfia i d'inflamació. Es distingeixen dues afectacions cel·lulars diferents, una mononuclear o polinuclear de cèl·lules inflamatòries en el compartiment epitelial i estromal, i una atròfia estromal amb fibrosi. Es pensa que la PIA podria ser una resposta a dany ambiental com l'estrès oxidatiu o la inflamació causats per repetides infeccions, factors dietètics o autoimmunitaris (Tomlins, Mehra et al. 2007).

### 1.1.5.4. Neoplàsia intraepitelial prostàtica (PIN)

El PIN es caracteritza per presentar els acins i els conductes prostàtics no tumorals juntament amb cèl·lules atípiques. Els canvis citològics es noten perquè els nuclèols són més prominents, hi ha engrandiment nuclear, augment de la densitat citoplasmàtica i variació de la mida nucleolar. El PIN d'alt grau es considera que avança cap a carcinoma prostàtic per diferents raons, entre elles que les lesions del PIN es troben en la zona perifèrica i que les anàlisis de les anomalies cromosòmiques i del desequilibri al·lèlic mostren que les lesions són multifocals. El PIN, però, no dóna nivells elevats de PSA i, per tant, es detecta només mitjançant biòpsia i no pas en sèrum (Joshua, Evans et al. 2008) (figura 2C).



**Figura 2.** Tinció amb hematoxilina i eosina de diferents talls pertanyents a patologies prostàtiques. **A)** Prostatitis. **B)** Hiperplàsia benigna de pròstata (HBP). **C)** Neoplàsia intraepitelial prostàtica (PIN).

## **1.2 CÀNCER DE PRÒSTATA**

### **1.2.1 Generalitats**

El càncer de pròstata es produeix en aquest òrgan quan les cèl·lules prostàtiques comencen a multiplicar-se descontroladament. La malaltia es desenvolupa majoritàriament en individus majors de 50 anys. El càncer de pròstata és el segon tumor més freqüent i la segona causa de mort per malaltia oncològica en els homes del món occidental. A Estat Units, Austràlia i Canadà és el tumor sòlid més comú (Siegel, Ward et al. 2011). A Catalunya les dades recollides en un estudi realitzat des del 1998 fins al 2007 demostren que el càncer de pròstata és el tipus de càncer més freqüent que afecta a la població masculina. Presenta una incidència del 21,3%, seguit del càncer de pulmó (15,1%) i de colon i recte (15%). A Catalunya es diagnostiquen uns 1500 casos nous a l'any, essent als 74 anys l'edat mitjana del diagnòstic.

### **1.2.2 Inici i progressió**

Les lesions PIN poden desencadenar en un carcinoma prostàtic per un trencament de la làmina basal juntament amb un desajustament de les cèl·lules luminals i basals. Les vies per les quals la lesió del PIN progressen fins a esdevenir carcinoma invasiu i independent d'andrògens són encara desconegudes, tot i que alguns candidats han estat implicats en el progrés de la malaltia. Per exemple, aberracions en molècules de senyalització com factors de creixement, proteïnes tirosina quinases, factors de transcripció, receptors nuclears i els seus lligands, supressors del creixement, reguladors del cicle cel·lular, etc. s'han identificat en alguns carcinomes prostàtics (Roy-Burman, Wu et al. 2004).

En els estadis inicials del càncer de pròstata, quan encara està confinat dins la càpsula prostàtica, és possible la curació mitjançant intervenció quirúrgica o radioteràpia. De fet, en molts casos el pacient amb càncer de pròstata es morirà per altres causes. En canvi, si no es detecta a temps o és un tumor molt agressiu, pot avançar ràpidament cap a altres estadis caracteritzats per la invasió de les vesícules seminals i durant la metastasi les cèl·lules tumorals migren, preferentment, cap als ossos. Després de la deprivació d'andrògens, els

tumors esdevenen androgen independents, augmenta la seva agressivitat i pot provocar la mort (Abate-Shen and Shen 2000).

### **1.2.3 Detecció**

Els pacients que pateixen un tumor de pròstata poden presentar símptomes relacionats amb l'obstrucció uretral (augmenta la freqüència urinària, hematúria, dificultat en l'inici de la micció o disúria) o no presentar-los.

El diagnòstic actual del càncer de pròstata es basa en un cribatge diagnòstic que consta de dues fases: una primera fase basada en l'anàlisi dels nivells de PSA en sèrum i el tacte rectal, i una segona fase de diagnòstic mitjançant la biòpsia prostàtica. El PSA és una proteïna secretada exclusivament per les glàndules prostàtiques. Quan els nivells de PSA en sèrum es situen per sobre de 4 ng/ml i/o quan el pacient presenta un tacte rectal sospitos, l'uròleg determina la necessitat de realitzar una biòpsia, que permetrà establir el diagnòstic definitiu del mateix pacient (Abate-Shen and Shen 2000)(Servei de control i prevenció del càncer de pròstata, Institut Català Oncologia, 2010). En una publicació recent, Rigau i col·laboradors han identificat altres possibles marcadors per al diagnòstic de càncer de pròstata analitzant l'orina de possibles candidats a patir càncer de pròstata, obtinguda després de la realització del massatge prostàtic (Rigau, Ortega et al. 2011).

### **1.2.4 Tractament**

Hi ha diferents possibilitats de tractament, entre elles la radioteràpia, el tractament quirúrgic o la teràpia hormonal. L'AR s'expressa en els tumors de pròstata primaris, per això el tractament de deprivació hormonal va dirigit cap al bloqueig del receptor.

La radioteràpia és un tractament d'acció local que es pot utilitzar enlloc de la cirurgia en les fases inicials de la malaltia, o bé després de la cirurgia per a eliminar possibles cèl·lules canceroses residuals. El tractament quirúrgic s'utilitza també en les fases inicials del tumor, i consisteix gairebé sempre en l'extracció total de la glàndula (prostatectomia radical; en alguns casos es conserven els nervis que permeten l'erecció del penis). A més de la prostatectomia també es pot realitzar una resecció transuretral, que consisteix en l'extracció d'una part de la pròstata a través de la uretra amb l'instrumental adequat.

En quan al tractament hormonal, el que es pretén és reduir els nivells d'hormones masculines que necessiten les cèl·lules epitelials prostàtiques per créixer i induir-los-hi apoptosi (la testosterona (T) passa de més de 200 ng/mL a 15 ng/mL, però no desapareix completament del sèrum ja que els nivells d'andrògens adrenals no varien). Així doncs, podem deprivar la majoria dels andrògens mitjançant la castració quirúrgica (orquidectomia), l'administració d'antiandrògens (castració química) o una combinació de tots dos mètodes. La manipulació de la unió androgen – AR té efectes secundaris en la teràpia de deprivació hormonal, entre ells, impotència, disminució de la libido, fatiga, sufocacions, alteració del perfil dels lípids o anèmia (Holzbeierlein, Castle et al. 2004; Holzbeierlein, McLaughlin et al. 2004).

La supressió androgènica intermitent s'ha utilitzar per alentir aquest procés selectiu i augmentar així l'efectivitat del tractament, però inevitablement el càncer de pròstata resistent a la castració (CRPC) apareix després de 18-24 mesos de teràpia (Loblaw and Cheung 2006). Un cop s'ha desenvolupat el tumor resistent, el pronòstic és pobre, tot i que es poden aplicar altres opcions com la prostatectomia, però poques vegades funciona.

Els antiandrògens no esteroidals (flutamida, nilutamida i bicalutamida) actuen competint amb els andrògens per la unió a l'AR. Com que s'inhibeix el *feedback* negatiu de la T a l'hipotàlem, els nivells d'aquesta disminueixen. Els anti-andrògens esteroidals (l'acetat de ciproterona) actuen inhibint l'AR i reduint els nivells de T. Els inhibidors químics del metabolisme de la T (ketoconazole i aminoglutethimide) interfereixen en la formació d'esteroïds precursors d'aquesta així com també d'altres esteroides.

La majoria dels agents quimioterapèutics tenen poc efecte en el CRPC quan són administrats sols. No obstant, hi ha diferents agents químics que han mostrat resultats prometedors i que estan en diferents fases d'estudis clínics (Friedlander and Ryan 2012). La combinació de quimioagents tradicionals amb citotòxics ha tingut cert èxit. El paclitaxel (un estabilitzador de la formació de microtúbuls) combinat amb estramustina (desestabilitza la unió de microtúbuls) presenta una citotoxicitat sinèrgica en els càncers de pròstata hormonoresistents. Algunes molècules petites que actuen com a agents bloquejants i oligonucleòtids antisentit dirigits contra molècules clau involucrades en creixement, metàstasis o angiogènesis s'estan desenvolupant i estan en assajos preclínic, actualment, amb resultats encoratjadors (Tsao, Galsky et al. 2012; Tsao, Small et al. 2012).

Existeixen, però, altres teràpies en el càncer de pròstata a part dels antagonistes d'AR, com els inhibidors d'enzims de la síntesi d'andrògens, inhibidors de la 5 $\alpha$  reductasa, (catalitza el pas de T a 5 $\alpha$ -Dihidrotestosterona (5 $\alpha$ -DHT)), inhibidors de la *heat shock proteins* 90 (Hsp90; protegeix l'AR de degradació), inhibidors de les histones deacetilases (HDACs) i de les tirosines quinases (Chen, Patil et al. 2008; Knudsen, Nelander Holm et al. 2009; Tran, Ouk et al. 2009), així com altres estratègies focalitzades en l'expressió del RNA: ribozims, oligonucleòtids antisentit, *short hairpin* RNA (shRNAs) i *small interfering* RNAs (siRNAs) (Eder, Culig et al. 2000; Ko, Devi et al. 2004; Chen and Meister 2005; Liao, Wang et al. 2005; Yang, Li et al. 2005). També es pot inhibir l'activitat amb microRNAs (miRNAs). Els miRNAs són RNAs reguladors petits (18 – 25 nucleòtids), endògens, molècules de RNA no codificants involucrades en la maduració post-transcripcional de l'expressió gènica. Els miRNAs fan la funció de supressors de tumors en diferents càncers. Funcionen unint-se a la seqüència parcialment complementària a la regió 3'UTR dels mRNAs diana, resultant en la repressió de la traducció o en la deprivació del mRNA (Bartel 2009). Els miRNAs poden contribuir en la carcinogènesi actuant com a supressors de tumor o oncogens (Zhang, Pan et al. 2007). El miRNA 488 redueix l'activitat transcripcional d'AR, bloqueja la proliferació, augmenta l'apoptosi de les cèl·lules del càncer de pròstata i inhibeix la producció endògena de proteïna en cèl·lules de càncer de pròstata androgen dependents i independents (Sikand, Slaibi et al. 2011). Aquest miRNA reprimeix l'expressió d'AR en les cèl·lules de càncer de pròstata unint-se al seu 3'UTR (4266 – 4289) (Sikand, Slaibi et al. 2011).

## **1.3EL RECEPTOR D'ANDRÒGENS**

### **1.3.1 Introducció**

Els andrògens són hormones esteroidals que regulen el desenvolupament i el manteniment del fenotip masculí. Tenen rols durant la diferenciació sexual masculina, durant el desenvolupament i manteniment de les característiques sexuals secundàries masculines i durant l'inici i manteniment de l'espermatogènesi. Els dos andrògens més importants són la T i la 5 $\alpha$ -DHT i cada un d'ells té un rol durant aquests processos. Les accions dels andrògens són mediades pel receptor d'andrògens (AR). Aquest receptor pertany a la família dels

receptors hormonals esteroidals, encarregats de portar els senyals extracel·lulars al nucli de les cèl·lules per a regular l'expressió dels gens diana.

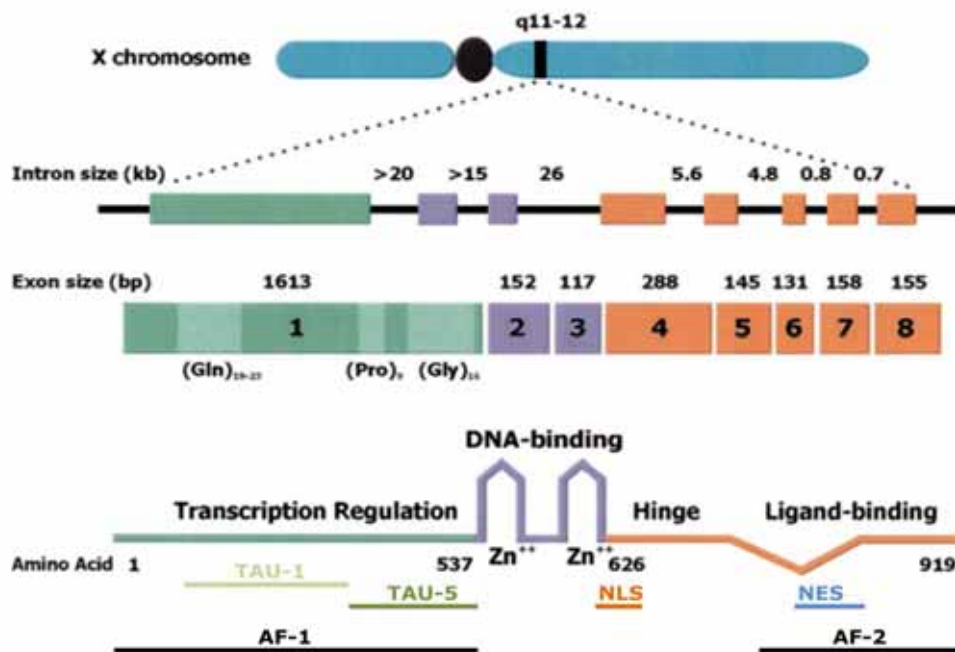
L'AR presenta una estructura modular conservada, com tots els receptors hormonals o receptors nuclears (RN). Aquests receptors regulen l'expressió gènica de manera induïble pel lligand. L'AR és ubiqüu en teixits de mamífers [teixit neural, muscular, esquelètic, teixit endocrí, etc. (Lindzey, Kumar et al. 1994)] i es troba al citoplasma "segrestat" i estabilitzat per la unió a les HSPs. Quan la T o la 5 $\alpha$ -DHT s'hi uneix, pateix canvis conformacionals que el porten a translocar-se al nucli, permetent la interacció amb els *androgen response elements* (AREs) dels diferents gens diana i la unió de coactivadors que modulen els senyals hormonals i medien l'inici de la transcripció (Heinlein and Chang 2004). A més de la funció de factor de transcripció, l'AR integra senyals cel·lulars mitjançant la interacció amb altres vies de senyalització centrals. Les funcions no nuclears són coordinades amb l'activitat nuclear que té lloc en la translocació a nucli.

### 1.3.2 El gen d'AR

L'organització genòmica del gen de l'AR està conservada en el regne dels mamífers des del ratolí fins a l'home (Gelman 2002). L'AR humà està codificat per un gen de còpia única que es troba al braç llarg del cromosoma X a la posició Xq11-12 (Lubahn, Joseph et al. 1988; Brown, Goss et al. 1989). El gen està format per 8 exons, anomenats de l'1 al 8, respectivament i ocupa aproximadament 180 kilonucleòtids o kilobases (kb) (figura 3). Dóna lloc a un transcrit de mRNA de 10,6 kb amb una seqüència codificant d'aproximadament 2757 nucleòtids. La regió no codificant del mRNA del receptor consta d'un extrem 5' *untranslated region* (UTR) d'1,1 kb de llargada, i d'un extrem 3' UTR. En l'extrem 5' UTR es van identificar dos llocs d'inici de la traducció pel gen de l'AR (Metionina 1 i Metionina 189)(Faber, van Rooij et al. 1991; Faber, van Rooij et al. 1993). El 3'UTR complet té una llargada de 6.8 kb i es troba a l'exó 8 del gen d'AR humà. En aquest extrem s'ha descrit una deleció de 3 kb del mRNA d'AR humà, causada per *splicing* alternatiu (Faber, van Rooij et al. 1991; Faber, van Rooij et al. 1993).

Entre els anys 1988 i 1989 es va clonar el cDNA de l'AR en diferents grups (Chang, Kokontis et al. 1988; Lubahn, Joseph et al. 1988; Trapman, Klaassen et al. 1988; Tilley, Marcelli et al.

1989), i fins a l'any 2005 només s'havia identificat un cDNA d'AR tot i presentar dos lligands (T i 5 $\alpha$ -DHT). La nova isoforma de l'AR (AR45) descrita l'any 2005 (Ahrens-Fath, Politz et al. 2005) es detalla en l'apartat 1.3.4 de la introducció.



**Figura 3.** Organització genòmica de l'AR. Es mostra la localització cromosòmica, l'organització exònica, les regions amb repeticions en el primer exó i l'estructura de la proteïna. Es localitzen les funcions de transactivació 1 i 2 (AF-1 i AF-2), les unitats d'activació transcripcional (TAU-1 i TAU-5), la seqüència de localització nuclear (NLS) i la seqüència d'exportació nuclear (NES). Extret i adaptat de (Gelmann 2002 J Clin Oncol.) i (Bennett, Gardiner et al. 2010 Int J. Biochem Cell Biol.)

El gen de l'AR codifica per una proteïna de 910-919 aminoàcids (Lubahn, Joseph et al. 1988; Trapman, Klaassen et al. 1988; Gelmann 2002), amb una massa molecular d'aproximadament 110 KDa (99 kDa no fosforilada i 110 KDa fosforilada). La variació en el número d'aminoàcids és deguda a les dues regions polimòrfiques homopolimèriques en la regió N-terminal (figura 3). Després de la seva síntesi, l'AR pateix diferents modificacions posttraduccionals que són necessàries per a què el receptor sigui funcional (Dehm and Tindall 2005; Gioeli and Paschal 2012). Aquestes modificacions són:



#### a) Fosforilació

La fosforilació és una de les modificacions més estudiades; és important per adquirir la capacitat d'unir-se a les hormones. Després de la unió del lligand, l'AR es tornarà dependent d'andrògens gràcies a la fosforilació, un pas que el protegeix de la degradació proteolítica i que li és requerida per a la importació o l'exportació nuclear i per a la unió al DNA (Brinkmann; Edwards and Bartlett 2005; Gioeli, Black et al. 2006). La fosforilació es dona en 10 llocs diferents del receptor, la majoria localitzats al domini N-terminal (Gioeli, Ficarro et al. 2002). La tirosina 534 (Y534) sembla ser important funcionalment ja que està conservada evolutivament. La seva fosforilació és important per al creixement del tumor en condicions de privació, ja que indueix la translocació nuclear del DNA en absència d'andrògens (Guo, Dai et al. 2006; Kraus, Gioeli et al. 2006)(figura 4).

			534	
Human AR	PSPTCVKSEM	GPWMDSYSGP	YGDMRLETAR	DHVLPIDYFF
Lemur AR	PSPSCVKSEM	GPWMESYSGP	YGDVRLETAR	DHVLPIDYFF
Dog AR	PSPSCVKSEM	GSWMESYSGP	YGDMRLETAR	DHVLPIDYFF
Mouse AR	PSPNCVKSEM	GPWMENYSGP	YGDMRLDSTR	DHVLPIDYFF
Rat AR	PSPSCVKSEM	GPWMENYSGP	YGDMRLDSTR	DHVLPIDYFF
Rainbow trout AR alpha	PNSPCIKNEV	GDSL DVS...	YTDARFEGGS	DHMYPMEFFF
Rainbow trout AR beta	PNSPYLKNEV	GDWLDVS...	YTDARFEGGR	DHMFPMEFFF
Red seabream AR	PNSSYVKSEV	GEWLDVP...	YSDPRFDSSS	EHMFPMEFFF

**Figura 4.** Alineament de les seqüències de proteïnes d'AR on es mostra la conservació evolutiva de la U534. Extret de Guo et al.,2006.

#### b) Ubiquitinació i sumoïlació

La ubiquitinació consisteix en l'addició d'una seqüència de 76 aminoàcids als residus de lisina i sovint és un senyal per a la degradació via proteosoma 26S (Glickman and Ciechanover 2002). L'AR també pateix sumoïlació (Poukka, Karvonen et al. 2000) possiblement en les mateixes lisines on també s'ubiquitina. La sumoïlació no marca les proteïnes per a la seva degradació, sinó per a regular, entre altres, l'activitat dels factors de transcripció (Muller, Hoege et al. 2001). No és sorprenent, doncs, que les modificacions covalents postraduccional que pateix l'AR estiguin relacionades amb el desenvolupament del càncer de pròstata.

### c) Degradació proteasomal d'AR

La degradació té un paper important en la regulació de la funció d'AR. L'AR no té una regulació dependent de lligand a nivell de proteïna, i és regulat per via de degradació sistèmica de proteïna, específicament per la via d'ubiquitinació del proteasoma MDM2. Per això estudis de teràpies sobre la degradació proteasomal d'AR per la via de la ubiquitinació per disminuir la proteïna són interessants com a tractament del càncer de pròstata (Lee and Chang 2003; Haelens, Tanner et al. 2007).

La proteïna d'AR presenta, com altres receptors nuclears (RN), una estructura modular de 4 dominis funcionals: domini N-terminal (de l'anglès, NTD), el domini d'unió al DNA (de l'anglès, *DNA binding domain* o DBD), la regió frontissa i el domini d'unió a lligand a l'extrem C-terminal (de l'anglès, *ligand binding domain* o LBD); cada domini juga un paper important en la funció i en la senyalització del receptor (McKenna, Lanz et al. 1999; Glass and Rosenfeld 2000; Heinlein and Chang 2004)(figura 3). Els dominis no funcionen de manera independent sinó que fan sinèrgia o s'antagonitzen entre ells per a produir la funció de l'AR que regula les accions genòmiques dels andrògens en els teixits diana. El DBD i el LBD estan 100% conservats entre els receptors nuclears mentre que la regió frontissa i el NTD ho estan entre el 70 i el 80%.

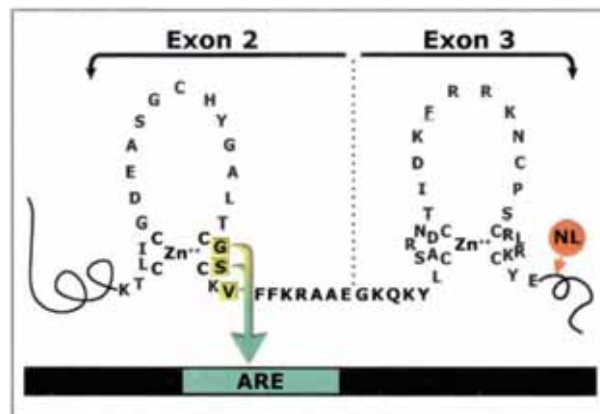
- Domini N-terminal o NTD: està codificat per l'exó 1 (cobreix dels aminoàcids 1-517 dels 919 aminoàcids de l'AR) i presenta la seqüència més variable en tots els RN. Regula el reclutament del complex de preiniciació de la transcripció (de l'anglès, PIC) cap als gens que responen a andrògens, reclutant o contactant els factors de transcripció basals com TFIIF. Després de la unió de TFIIF adopta una estructura més compacta. El NTD presenta 3 regions d'aminoàcids conservades. La primera consisteix en 14 aminoàcids (233-246) que contenen la funció de transactivació 1 (AF-1) de l'AR (He, Gampe et al. 2004). AF-1 abasta dues unitats d'activació transcripcional, TAU 1 (aminoàcids del 100 al 370) i TAU 5 (del 360 al 528) (Chamberlain, Whitacre et al. 1996; Callewaert, Van Tilborgh et al. 2006). Es creu que interacciona amb les HSP i limita l'activitat transcripcional d'AR. La segona regió recull dos dominis, el FXXLF (de l'aminoàcid 23 al 27) i el WXXLF (de l'aminoàcid 433

al 437), on X és qualsevol aminoàcid. En humans, les seqüències són: FQNLF i WHTLF, respectivament (He, Kemppainen et al. 2000). Aquests dos motius estableixen i dirigeixen la interacció entre l'AF-1 del NTD i l'AF-2 del LBD, donant una interacció intramolecular o intermolecular entre els dominis NH<sub>2</sub>-COOH, important per a l'activació transcripcional per alguns gens diana de l'AR (Dubbink, Hersmus et al. 2004). L'exó 1 codifica per dos homopolímers d'aminoàcids, la tercera regió d'aminoàcids conservats. El primer homopolímer és el tracte de poliglutamines (CAG), que presenta una mitjana de 28±2 repeticions (Chamberlain, Driver et al. 1994; Ding, Xu et al. 2004). El segon, un tracte de poliglicines (GGN) presenta una mitjana de 23±1 repeticions (Ding, Xu et al. 2005). Tot i que la funció no està completament definida, el càncer de pròstata i la malaltia de Kennedy s'han associat a la longitud d'aquests tractes (La Spada, Wilson et al. 1991). Els pacients amb aquesta malaltia tenen més de 40 repeticions CAG, resultant en una transactivació menor de l'AR. S'ha comprovat *In vitro* que una disminució de CAG augmenta l'activitat d'AR en promotors simples. Es creu també que proporciona un control inhibitori del NTD (Ding, Xu et al. 2004). També estaria involucrat en l'alineament entre NTD i LBD.

NTD és constitutivament actiu i pot activar la transcripció de manera independent als andrògens (Jenster, van der Korput et al. 1991; Simental, Sar et al. 1991).

- DBD: és la regió més conservada en la família dels RN. Per activar la transcripció dels gens regulats per hormones, els RN han de reconèixer i unir-se als *hormone response elements* (HRE) adequats a través del DBD. El DBD d'AR presenta 66-68 aminoàcids codificats pels exons 2 i 3 (Lubahn, Joseph et al. 1988), i s'uneix als AREs per regular l'expressió dels gens que responen a andrògens. Presenta 9 cisteïnes, de les quals 8 estan implicades en la formació de dos dits de zinc (cada un codificat per un exó) (figura 5), que regulen el reconeixement i la unió als AREs. Els dos dits formen una estructura compacta que s'uneix al solc major del DNA (Hard, Kellenbach et al. 1990). El primer dit, el més proper a l'extrem N-terminal, determina l'especificitat de reconeixement del DNA; conté la P-box, 5 aminoàcids que fan contacte base-específic amb els nucleòtids del DNA. El segon dit està involucrat en la dimerització d'AR; conté la D-box, regió que estableix la unió del complex amb el primer dit de

zinc i determina els requeriments d'espai per als AREs (repeticions de 5'TGTTCT3'). Dos monòmers d'AR s'uneixen en la conformació *head-to-head* i s'uneixen com un homodímer als AREs. El segon dit també es necessita per la dimerització del receptor que té lloc durant la unió al DNA (Luisi, Xu et al. 1991). El segon dit de zinc presenta dues arginines adjacents (Arg607 i Arg608) que s'han trobat mutades en individus amb càncer de pròstata hormonoindependent i acaben desenvolupant càncer de mama. (Wooster, Mangion et al. 1992; Lobaccaro, Lumbroso et al. 1993; Lobaccaro, Lumbroso et al. 1993). L'extensió C-terminal del DBD juga un paper important en la mediació de la selecció de l'AR per a la interacció amb el DNA (figura 3).



**Figura 5.** Seqüència d'aminoàcids del DBD d'AR i la formació dels dits de zinc. Els tres residus G, S i V estan altament conservats en els receptors hormonals. En vermell es marca la NLS. Extret de E P. Gelmann, *J Clin Oncol.* 2002.

- Regió frontissa: s'expandeix de l'aminoàcid 625/8 al 669 i és la connexió flexible entre el DBD i LBD. Comprèn la part C-terminal del DBD i la primera hèlix del LBD (figura 3). Conté la senyal de localització nuclear (NLS) depenent de lligand (des de l'aminoàcid 617 al 633; **RKCYEAGMTLGARKLKK**) (Zhou et al., 1994) per a la importació nuclear d'AR (Poukka, Karvonen et al. 2000); mutacions en NLS comporten una localització d'AR al citoplasma perquè impedeixen la translocació a nucli. Aquesta regió participa en la unió del DNA (Haelens, Verrijdt et al. 2003) i en la regulació de l'activitat transcripcional, modulant la interacció NTD/LBD (Zhou, Wong et al. 1994; Buchanan, Yang et al. 2001). Aquesta regió conté la seqüència PEST (seqüència rica en residus de prolina, àcid glutàmic, serina i treonina) que pot ser important per la

degradació del receptor pel proteasoma 26S i un lloc important de fosforilació (Zhou, Kempainen et al. 1995; Tanner, Claessens et al. 2004). La regió frontissa té importància en l'estabilització del LDB en presència d'hormones o corepressors (Pissios, Tzamelis et al. 2000). La importina  $\alpha$  s'uneix a la NLS d'AR (Lonergan and Tindall; Schaufele, Carbonell et al. 2005). La filamina A (proteïna del citoesquelet) interacciona amb la regió frontissa, DBD i LBD d'AR, facilitant la translocació nuclear. La interacció AR-Filamina A no és dependent d'andrògens però augmenta en la seva presència (Ozanne, Brady et al. 2000)(figura 8).

- LBD: comprèn de l'aminoàcid 669 al 919 (figura 3). L'AR és una proteïna citoplasmàtica quan no té el lligand unit. Al citoplasma es troba unida a diferents xaperones moleculars, com HSP90, HSP70 i coxaperones FKBP52-BP (Pratt and Toft 2003; Cheung-Flynn, Prapapanich et al. 2005). Sense andrògens, les HSPs mantenen al receptor de forma inactiva. Després de la unió al lligand, el receptor canvia la conformació, s'alliberen les HSPs, l'AR es transloca a nucli i regula la transcripció dels seus gens diana. *In vitro*, la translocació de citoplasma a nucli tarda entre 15 i 30 minuts (Poukka, Karvonen et al. 2000). *In vivo*, hi ha sempre algun AR a nucli, fins i tot en presència de poca concentració d'andrògens.

El LBD el codifiquen els exons 4, 5, 6, 7 i 8 de la part C-terminal de l'AR. Adopta una estructura tridimensional on 11 hèlix  $\alpha$  i 4 làmines  $\beta$  amb dues fulles antiparal·leles formen la butxaca d'unió del lligand (LBP) i la superfície d'interacció amb coactivadors i corepressors (Matias, Donner et al. 2000). Hi ha 18 aminoàcids que interaccionen directament amb la unió d'andrògens en LBP, la majoria són hidrofòbics. L'AF-2 es troba al LBD. És dèbil transcripcionalment i és la major superfície d'interacció proteïna-proteïna utilitzada pels RN per a reclutar coactivadors que continguin el motiu LXXLL (Ikonen, Palvimo et al. 1997; Moilanen, Rouleau et al. 1997). L'AR es diferencia dels altres RN perquè interacciona amb coactivadors de manera única. AR necessita la regió AF-2 per a la interacció dependent de lligand important entre NTD/LBD. Aquesta regió regula el reclutament de coreguladors que es requereix pel control precís de l'activitat transcripcional de l'AR (Ikonen, Palvimo et al. 1997; He, Kempainen et al. 1999). La butxaca hidrofòbica del

LDB d'AR prefereix el motiu FXXLF, incloent 23-FQNLF-27 del NTD i interacciona dèbilment amb LXXLL. Així facilita la interacció intramolecular i intermolecular entre els dominis N-terminal i C-terminal. La interacció N/C terminal passa predominantment quan l'AR no està unit a DNA. Tot i així, també s'han vist coactivadors units, indicant una competició entre aquestes proteïnes reguladores i l'extrem N-terminal per unir-se a AF-2. Per això AF-2 té un paper dèbil en la transactivació de manera depenent de lligand. AF-2 presenta una seqüència altament conservada en els RN (EMMAEISV) on s'ha vist, a través d'anàlisi mutacionals, que cada aminoàcid juga un paper important en la interacció NTD/LBD i/o la resposta als coreguladors. Quan arriba el lligand, el LBD canvia de conformació, estabilitzant-se i exposant l'AF-2 per a la interacció amb NTD i coreguladors (Bourguet, Vivat et al. 2000). El LBD també participa en la interacció entre l'AR i les HSPs. El LBD conté una senyal d'exportació nuclear (NES) en els aminoàcids 742-817 que funciona en absència de lligand i domina sobre la NLS. En presència de lligand, la NES és inactiva deixant que la NLS dirigeixi la translocació d'AR a nucli (Heinlein and Chang 2002). El LBD d'AR pot unir tant el lligand amb efecte agonista com antagonista en l'activitat d'AR (Matias, Donner et al. 2000; Nagy and Schwabe 2004). Tots dos tipus de lligands s'uneixen a LBP. Els antagonistes es divideixen en dos grups. Els del primer grup no permeten que l'AR s'uneixi al DNA però el receptor es transloca a nucli (Jenster, Trapman et al. 1993). El segon grup permet al receptor unir-se al DNA, però indueix una conformació que interromp l'associació entre coreguladors i inhibeix l'activació de la maquinària transcripcional (Smith 1997). Els antagonistes poden ser esteroidals o no esteroidals (bicalutamida i hidroxiflutamida). Els no esteroidals són considerats antagonistes selectius perquè no bloquegen l'acció dels andrògens, però estimulen l'eix hipotàlem-hipofisari que augmenta la T i la 5 $\alpha$ -DHT (Neumann and Topert 1986). El bloqueig de l'acció dels andrògens utilitzant antagonistes és molt freqüent en el tractament del càncer de pròstata avançat. Malauradament, no són teixit específics i poden tenir altres efectes (Hiranrat, Katavetin et al. 2003).

Defectes en el gen d'AR prevenen el desenvolupament normal de les estructures masculines internes i externes. També s'associen a dues situacions patològiques amb l'estructura

anormal de l'AR: la malaltia de Kennedy (o atrofia muscular progressiva espinobulbar) i el càncer de pròstata.

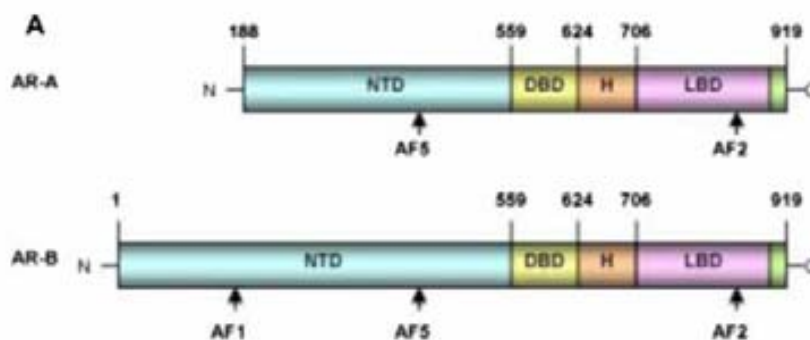
### 1.3.3 Transcripció del gen d'AR

La transcripció del gen d'AR per a donar lloc a la proteïna és un procés molt regulat. El promotor de l'AR humà és TATA-less, és a dir, no presenta caixa TATA ni tampoc CCAAT (Tilley, Marcelli et al. 1989; Faber, van Rooij et al. 1993). L'AR sí presenta una caixa GC (-50/-32) i un tracte de purines llarg (-117/-60) (Faber, van Rooij et al. 1991; Faber, van Rooij et al. 1993). Els factors de transcripció que augmenten l'expressió del receptor són el Sp1, CREB i c-myc. NF- $\kappa$ B i NF-1 disminueixen l'expressió de l'AR (Mizokami and Chang 1994; Supakar, Jung et al. 1995; Chen, Supakar et al. 1997; Grad, Dai et al. 1999; Song, Jung et al. 1999). La unió de Sp1 juga un paper important en l'inici de la transcripció ja que en els gens que no presenten caixa TATA és capaç de mediar l'inici de la transcripció influenciant en la formació del complex d'inici de la transcripció (Pugh and Tjian 1991). Anàlisis de protecció a la nucleasa S1 indiquen que l'AR utilitza el mateix promotor en teixits humans com el testicle i la pròstata o en línies cel·lulars de càncer de mama (T47D i MCF-7) o la línia de càncer de pròstata LNCaP (Tilley, Marcelli et al. 1989).

A més a més dels factors de transcripció, altres elements com els HRE són reconeguts per l'AR així com també pel receptor de glucocorticoides (GR) i de progesterona (PR); l'AR presenta un procés d'autoregulació. Els andrògens poden augmentar o disminuir l'expressió de l'AR a nivell de mRNA i de proteïna (Tan, Joseph et al. 1988; Takeda, Nakamoto et al. 1991; Chang, Saltzman et al. 1995; Gelmann 2002), però altres elements reguladors trobats en el promotor d'AR suggereixen que altres hormones podrien regular l'expressió del receptor. Això faria que l'expressió de l'AR fos dependent del tipus cel·lular (Grossmann, Lindzey et al. 1994; Mizokami and Chang 1994).

### 1.3.4 Isoformes d'AR

Hi ha diversos gens que presenten primers exons alternatius no codificants o exons alternatius en regions intròniques. Tot i que en altres receptors nuclears s'han trobat diferents variants de mRNA originades per *splicing* alternatiu en diferents teixits, en l'AR no se n'havia descrit cap fins al 1994 (Wilson and McPhaul 1994; Hirata, Shoda et al. 2003). Wilson i McPhaul van descriure l'existència d'una "possible isoforma" d'AR, AR-A, que codificava per una proteïna de 87 kDa (li manquen 187 aminoàcids en l'extrem N-terminal degut a proteòlisi) i que es va trobar en els fibroblasts de la pell dels genitals humans. Aquesta isoforma presentava un inici de traducció alternatiu situat a la metionina 188 (mantenint la pauta de lectura d'AR) i representa el 10% de la proteïna AR ja que la regió flanquejant d'aquest ATG no presenta una seqüència Kozak consens (Kozak 1999). No obstant, com que AR-A prové del mateix transcrit de mRNA que AR-B, no es considera una variant d'*splicing* alternatiu (Wilson and McPhaul 1994; Gao and McPhaul 1998; Hirata, Shoda et al. 2003)(figura 6).

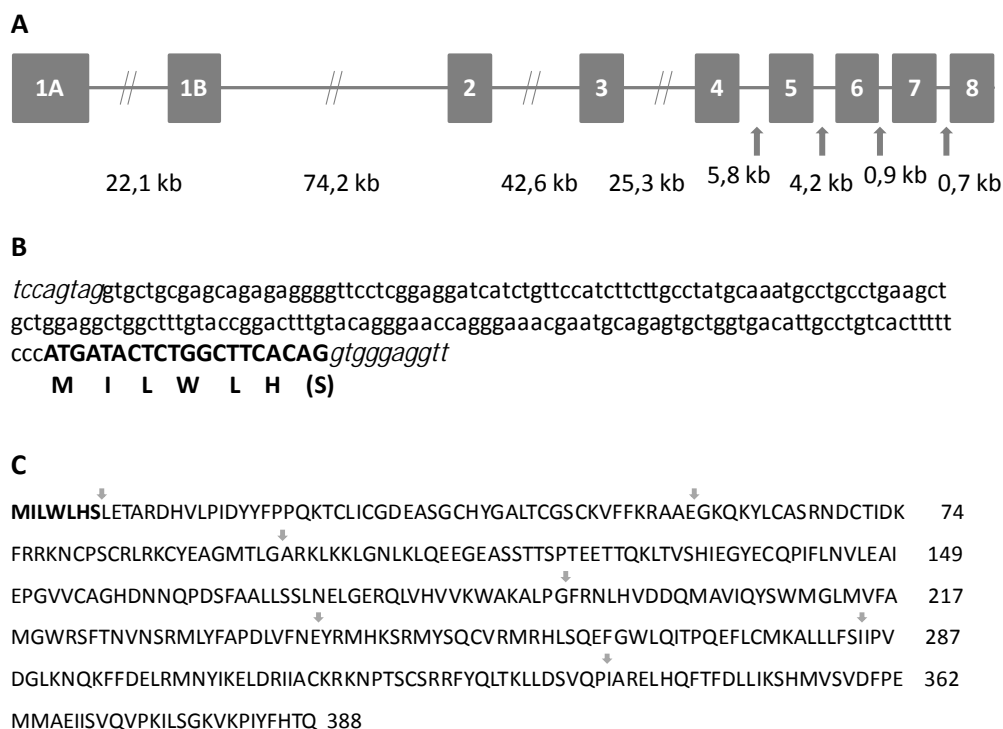


**Figura 6.** Dominis estructurals de les dues isoformes de l'AR (AR-A and AR-B). Els números sobre les barres fan referència als aminoàcids que separen els dominis estructurals de l'AR. Extret de (Friedlander and Ryan 2009 Curr Oncol Rep.)

L'any 2005 Ahrens-Fath i col·laboradors (Ahrens-Fath, Politz et al. 2005) van identificar, mitjançant la tècnica del 5' *Rapid Amplification of cDNA Ends* (5'RACE) amb RNA de placenta, una variant natural de l'AR, anomenada AR45. En la recerca d'homologia es va comprovar que la regió específica d'AR45 estava al cromosoma Xq11, entre els exons 1 i 2 del gen d'AR i que a aquesta variant li faltava la regió de 538 nucleòtids codificada per l'exó 1 del gen d'AR.



La seqüència completa del DNA d'aquest nou exó es va anomenar 1B. L'AR 1B està localitzat 22,1 kb més avall de l'exó 1A i no es va predir mitjançant programes informàtics. L'exó 1B està unit als exons 2, 3, 4, 5, 6, 7 i 8 (figura 7A i 7B). El control de la transcripció el realitza el promotor situat a l'extrem 5' adjacent a l'exó 1B. Aquesta isoforma d'AR està composta pel domini d'unió al DNA (DBD), la regió frontissa, el domini d'unió a lligand (LBD) i per una extensió de 7 aminoàcids de longitud a l'extrem N-terminal. La massa molecular deduïda per la proteïna era de 45 KDa, d'aquí el nom AR45 (figura 7C). Aquesta variant s'expressa principalment a cor i a múscul esquelètic, tot i que també s'expressa en úter, pròstata, pit i pulmó, i en menor mesura en testis.



**Figura 7. A)** Localització de l'exó 1B en el gen d'AR indicant la mida dels introns en kilobases (kb). **B)** DNA i aminoàcids deduïts de l'exó 1B. La pauta de lectura està en negreta. **C)** Seqüència d'aminoàcids deduïda de l'AR45. L'extrem N-terminal està en negreta. Les fletxes marquen el límit entre exons. Número d'accés de la seqüència al GenBank: AX453758. Adaptat de Ahrens – Fath et al.,2005.

La seqüència consens del factor de transcripció específic de cor Nkx2.5 (CAAGTG) i el 90% d'identitat del lloc d'unió per a p65 (subunitat del factor de transcripció NFκB que regula l'expressió de gens en cor) es troben en la regió immediatament a 5' de l'exó 1B. La

localització subcel·lular es va determinar mitjançant constructes (AR45 + GFP) en la línia cel·lular PC3; es va observar localització exclusivament nuclear (Ahrens-Fath, Politz et al. 2005).

En experiments de cotransfecció es va veure que l'AR45 inhibia la funció de l'AR de 110 kDa, un efecte que necessita que el DBD i el LBD estiguin intactes. La sobreexpressió d'AR45 disminueix la proliferació de les LNCaP. I en assajos de doble híbrid es va comprovar que l'AR45 interaccionava amb el domini N-terminal d'AR, indicant que la inhibició d'AR era deguda a un heterodímer AR110 - AR45. En condicions de sobreexpressió de TIF2 (un coactivador transcripcional) o de  $\beta$ -catenina (oncogen) l'AR45 estimula els promotors dependents d'andrògens en presència de DHT. De tot això van deduir un rol important de l'AR45 en la modulació de la funció de l'AR i afegeix més complexitat a l'hora d'entendre la manera d'actuar dels andrògens (Ahrens-Fath, Politz et al. 2005).

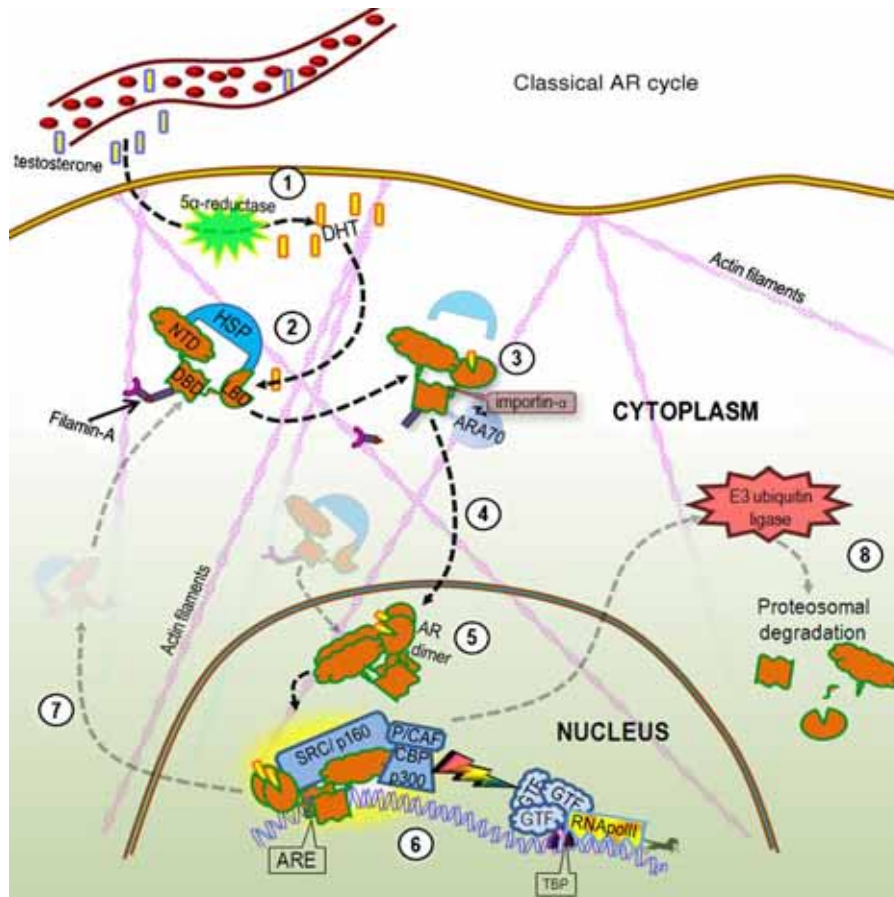
#### **1.3.4.1 Comparació filogenètica d'AR45**

Com que la família dels receptors esteroidals té un paper important en la funció hormonal, es van analitzar els genomes de diferents organismes per veure si expressaven AR45. Comparant la seqüència d'AR45 d'*Homo sapiens* amb altres espècies van trobar que l'exó 1B estava conservat en primats no humans com al ximpanzé (*Pan troglodytes*), l'orangutà (*Pongo pygmaeus*), el macaco (*Macaca mulatta*) i el tití (*Callithrix jacchus*). També en l'elefant (*Loxodonta africana*), en el porc (*Sus scrofa*) i en el gos (*Canis familiaris*). Al quantificar els nivells del transcrit d'AR45 en cor, múscul esquelètic i pulmó de macaco van obtenir alts nivells d'expressió en cor. Dels 7 aminoàcids del primer exó d'AR45, els 4 primers eren idèntics en les 8 espècies citades anteriorment; els altres 3 variaven una mica. Al comparar AR1B humà amb el de ratolí (*Mus musculus*) o amb el de rata (*Ratus norvegicus*) es van observar més divergències. En aquestes dues espècies es va trobar un codó *stop* més avall del potencial codó d'iniciació de la traducció en la seqüència de proteïna deduïda, indicant que probablement no existeixi la proteïna AR45 en dites espècies. Aquestes troballes en la comparació filogenètica tenen una implicació important en l'acció de les hormones sexuals masculines en els diferents organismes (Weiss, Faus et al. 2007).

### 1.3.5 Acció genòmica dels andrògens

Sense la presència d'andrògens, l'AR està en el citoplasma formant un complex amb les HSP 90, 70 i immunofilines FSKB (Pratt and Toft 1997; Pratt and Toft 2003). La T entra a la cèl·lula, es transforma en  $5\alpha$ -DHT i s'uneix a l'AR. La unió del lligand amb el receptor comporta un canvi conformacional on les HSPs s'alliberen i l'AR es transloca a nucli (Heinlein and Chang 2001; Pemberton and Paschal 2005). Un cop dins del nucli, l'AR unit a l'androgen localitza els AREs del gen diana i s'hi uneix (Claessens and Gewirth 2004)(figura 8). Aquesta unió és necessària per a l'activitat transcripcional; s'inicia la formació del PIC en la regió promotora dels gens que responen a andrògens i que inclou els TFII A-H i la RNA Polimerasa II (Lee, Duan et al. 2001). Els gens regulats per andrògens són biomarcadors potencials en malalties androgen independents, ja que tot i que el PSA és un bon marcador per a la recurrència, no és precís en definir l'alteració de la senyalització d'AR específica de càncer.

El model clàssic d'acció de les hormones esteroidals defensa que les hormones difonen a dins de la cèl·lula, s'uneixen al receptor i indueixen la transcripció del gen diana. El temps transcorregut entre l'entrada de l'hormona a la cèl·lula i l'acumulació de la proteïna que afecta la funció cel·lular oscil·la entre 15 - 30 minuts i diverses hores.



**Figura 8.** Cicle clàssic de l'AR, on l'AR s'ha representat en vermell i de manera modular amb els seus dominis. Extret de (Bennett, Gardiner et al. 2010, Int J Biochem Cell Biol).

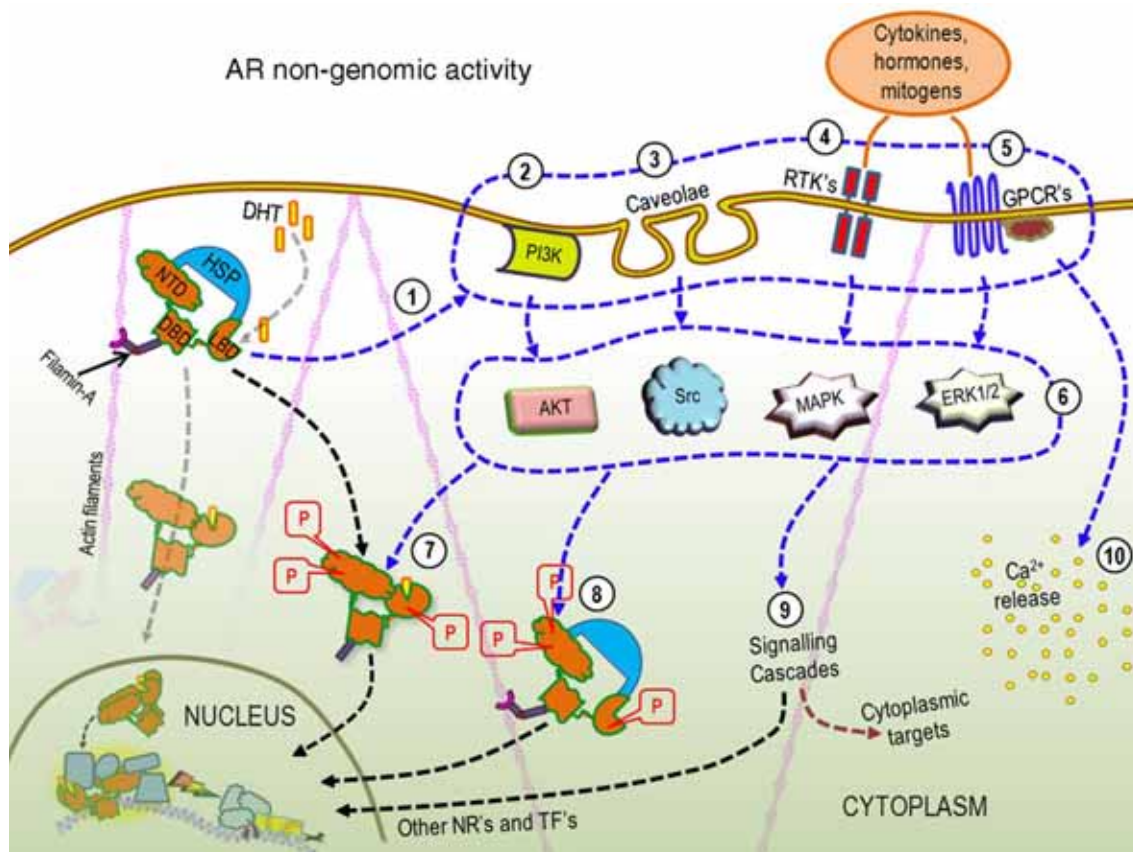
### 1.3.6 Acció no genòmica dels andrògens

A diferència de les accions genòmiques, en l'acció no genòmica hi ha una resposta cel·lular ràpida que té lloc entre segons i minuts, tot i que pot passar en períodes de temps més llargs. Els efectes de l'acció no genòmica no donen alteracions en la transcripció i síntesi de la proteïna, sinó que activen o reprimeixen les cascades de senyalització de les quinases citoplasmàtiques i els nivells intracel·lulars de calci (Losel and Wehling 2003).

Les proteïnes quinases implicades en la fosforilació de l'AR són activades per diferents senyals i faciliten el reclutament de coactivadors o d'altres components de la maquinària de transcripció que coopera amb l'AR per aconseguir l'activació transcripcional. Fins al 2002, l'existència o funció dels efectes no genòmics dels andrògens no estava provada i encara no

s'havia descrit l'AR45 (Heinlein and Chang 2002). Es creu que en absència d'un nou AR citoplasmàtic o a membrana, el senyal d'AR és transmès a la via de senyalització PI3K/Akt a través de la proteïna de membrana caveolina-1 (Li, Ren et al. 2003). La via caveolina-1/PI3K/Akt promou supervivència cel·lular i podria estar involucrada en metàstasi en el càncer de pròstata (Li, Yang et al. 2001; Baron, Manin et al. 2004; Freeman, Cinar et al. 2005) (figura 9).

Els factors de creixement i les citokines tenen un rol important en la regulació d'AR. S'ha vist que la IL-6 està sobreexpressada en pacients amb càncer de pròstata en sèrum i teixits i que és capaç d'activar l'AR de manera lligand independent. IGF-1 i EGF també estan augmentats en el càncer de pròstata, activant l'AR de manera lligand independent (Lonergan and Tindall 2012)(figura 9).



**Figura 9.** Activitat no genòmica de l'AR. Extret de Bennett et al.,2010. Int J Biochem Cell Biol.

### **1.3.7 AR i pròstata**

Els andrògens són produïts per les cèl·lules de Leydig dels testicles (testosterona: 90-95%) i les glàndules adrenals (5-dehidroepiandrosterona i androstenediona: 5-10%) mentre que la conversió a 5 $\alpha$ -DHT mitjançant la 5 $\alpha$ -reductasa té lloc a la pròstata. Aquesta és la responsable de produir la major part del fluid seminal en l'ejaculació. La unió dels andrògens a l'AR, localitzat a les cèl·lules epitelials i estromals de la pròstata (Litvinov, De Marzo et al. 2003) contribueix a la diferenciació, al metabolisme, a la proliferació i la supervivència d'aquestes cèl·lules. L'AR és clau en el desenvolupament del tumor de pròstata ja que modula l'expressió de reguladors del cicle cel·lular per facilitar el creixement cel·lular i la progressió de les cèl·lules epitelials i estromals en el cicle cel·lular (Yeap, Wilce et al. 2004).

### **1.3.8 AR i càncer de pròstata**

El desenvolupament del càncer de pròstata depèn de la presència d'andrògens (no hi ha tumor ni hipertròfia si no hi ha andrògens). Els mascles castrats abans de la pubertat o amb deficiències en la 5 $\alpha$ -reductasa no desenvolupen càncer de pròstata. L'AR és la major diana terapèutica en el tractament del càncer de pròstata i hi juga un paper crucial en el desenvolupament i en la seva progressió (Richter, Srivastava et al. 2007). La via de senyalització d'AR és important per la progressió del tumor, fins i tot quan el nivell d'andrògens és baix, essent activada per altres lligands com IGF-1 o EGF (Yeap, Wilce et al. 2004). L'activació de l'AR estimula el creixement dels càncers de pròstata androgen dependents i independents.

La majoria dels tumors de pròstata estan localitzats i només un terç envaeix el teixit del voltant, metastatitzant a òrgans llunyans (ossos) causant la mort. La mitjana de supervivència dels pacients amb càncer localitzat és superior als 5 anys (viuen entre 1 i 3 anys si hi ha metàstasi).

Els pacients que presenten un tumor de pròstata avançat, localitzat o metastàtic, són sotmesos a la teràpia de deprivació androgènica. Tot i que entre el 70% i el 80% dels pacients responen a aquests tractaments, amb el pas del temps la malaltia progressa, augmenta el PSA en sèrum, augmenta la mida del tumor i reapareixen els símptomes de la

malaltia. Aquest nou fenotip o estat tumoral es defineix com a càncer de pròstata resistent a la castració (CRPC) (Loblaw and Cheung 2006).

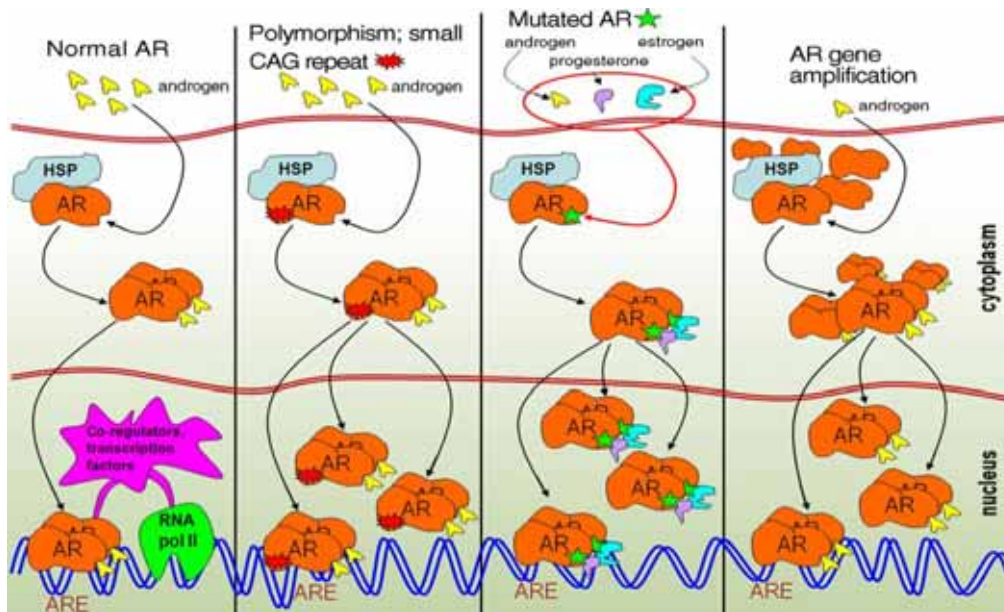
L'augment en el mRNA i proteïna d'AR són necessaris i suficients per convertir el creixement del càncer de pròstata d'hormonosensible a hormono-resistent.

Des del treball de Huggins i Hodges l'any 1941 (Huggins and Hodges 2002), on van demostrar que el càncer de pròstata metastàtic regressava amb la castració quirúrgica, la teràpia de la supressió hormonal (castració química o quirúrgica) ha estat un dels tractaments estàndards més aplicats en els càncers de pròstata avançats. El bloqueig hormonal del càncer de pròstata controla el creixement tumoral durant molt temps. Tot i que inicialment respon a la privació hormonal, progressa cap a una fase clínica de resistència a la teràpia inevitable i irreversible en menys de 2 anys. La teràpia hormonal és inefectiva ja que al final els tumors creixen d'una manera independent als andrògens. S'han hipotetitzat diferents mecanismes com les diferències genètiques en la subpoblació tumoral resistent a la castració (Sharifi and Kramer 2007), les variacions genètiques, canvis epigenètics i alteracions de la regulació transcripcional i de traducció, deixant que el tumor progressi sense la unió del lligand. Es pensa també que els andrògens residuals intratumorals (o la seva producció) o els adrenals, poden ajudar al desenvolupament del tumor de pròstata resistent a la castració (Tsoo, Galsky et al.). Un estudi recent demostra que en condicions de privació d'andrògens, l'AR ocupa un seguit de loci amb estructures de la cromatina constitutivament obertes a les quals els hi manquen els AREs. Aquestes unions d'AR de manera independent de lligand porten a un programa d'expressió gènica diferent i permet créixer a aquests tumors de pròstata resistents a la castració. Així doncs, els investigadors que han realitzat aquests estudis conclouen que tots dos programes d'expressió (androgen dependent i independents d'AR) són mecanismes importants per a la supervivència i el creixement dels tumors resistents a la teràpia de privació hormonal (Decker, Zheng et al. 2012). La rellevància de cada una depèn de l'estat del tumor i del microambient d'aquest, permetent que l'activació d'una via de senyalització androgen independent faciliti el creixement i la supervivència de les cèl·lules tumorals en individus privats d'andrògens (Decker, Zheng et al.). Els andrògens intraprostàtics són capaços d'activar l'AR, tot i que hagin disminuït (Mizokami and Chang 1994; Mostaghel, Page et al. 2007).

Entre els factors implicats en el manteniment de l'activitat transcripcional de l'AR en CRPC es troben les mutacions i amplificacions de l'AR, l'alteració de les proteïnes quinases, l'alteració dels factors de creixement, de les citoquines i dels coactivadors dels receptors nuclears que juguen un paper important en el desenvolupament d'aquest tipus de tumor (Lonergan and Tindall; Feldman and Feldman 2001; Gelmann 2002)(figura 10). Tot i així, les mutacions en l'AR només s'han observat en menys del 10% dels casos (Taplin, Rajeshkumar et al. 2003). Com ja hem dit, hi ha connexió entre els factors de creixement i les vies de senyalització, així com també n'hi ha entre aquestes i les citoquines en el càncer de pròstata resistent a la deprivació hormonal (Di Lorenzo, Tortora et al. 2002; Di Lorenzo, Autorino et al. 2003; Krueckl, Sikes et al. 2004; Bartlett, Brawley et al. 2005; George, Halabi et al. 2005).

Les interleuquines (IL) 6 i 8 juguen un paper important en la regulació de diferents events en alguns tipus de càncer (Culig and Pühr 2011). La IL-6 és produïda per la pròstata, les cèl·lules immunes i els osteoblasts. Aquesta s'uneix al seu receptor i desencadena una cascada de fosforilacions. IL-6 regula l'AR de manera independent de lligand, però l'efecte en el creixement del tumor resistent és variable (Malinowska, Neuwirt et al. 2009). La IL-6 està augmentada en el sèrum i en el teixit del CRPC, per això es postula com una diana terapèutica (Aaronson, Muller et al. 2007). La IL-8 contribueix en l'angiogènesi i la metastasi perquè induïx la MMP-9 (Seaton, Scullin et al. 2008). A més, la IL-8 augmenta l'activitat transcripcional d'AR i disminueix l'eficàcia dels antiandrògens (Araki, Omori et al. 2007). L'EGF i el seu receptor estan implicats en la patogènesi de diferents tumors, entre ells, el càncer de pròstata (Traish and Morgentaler 2009). La seva activació en el càncer de pròstata porta a l'activació de la via de la MAPK. L'EGF també pot induir la sobreexpressió de la IL-6 i la IL-8 en el càncer de pròstata (Peterziel et al., 1990). La via de la IGF s'ha implicat en la modulació de la senyalització d'AR (fosforilació, translocació a nucli, etc.) en presència i absència d'andrògens (Culig, Hobisch et al. 1994).





**Figura 10.** Canvis en l'activitat d'AR degut a les modificacions gèniques. Extret de (Bennett, Gardiner et al. 2010).

L'activació d'Akt pot induir un fenotip invasiu acompanyat d'activitat augmentada de MMP-2. MMP-2 i MMP-9 regulen la invasió, i l'activitat de totes dues està regulada per l'AR (Hara, Miyazaki et al. 2008).

### 1.3.8.1 Importància de la fosforilació d'AR en el càncer de pròstata

Els factors de creixement i la tirosina quinasa estan augmentats en la teràpia de privació hormonal del càncer de pròstata, induint la fosforilació d'AR que contribueix a l'activació de l'AR dependent de lligand o el sensibilitza a nivells baixos d'hormona (Guo, Dai et al. 2006) i la regulació de la transcripció dels gens diana. Els nivells de fosforilació són elevats en el càncer de pròstata resistent a la privació hormonal mentre que els nivells baixos de fosforilació d'AR es detecten en el teixit murí de pròstata normal i en teixit de pròstata humana benigne. L'augment de la fosforilació de les tirosines d'AR i de l'activitat de Src s'associen a la progressió del càncer de pròstata. La translocació d'AR de citoplasma a nucli és essencial per a què AR exerceixi la seva activitat transcripcional en les cèl·lules. La fosforilació de Y534 en l'AR és requerida per a la translocació nuclear d'AR promoguda per Src en condicions de

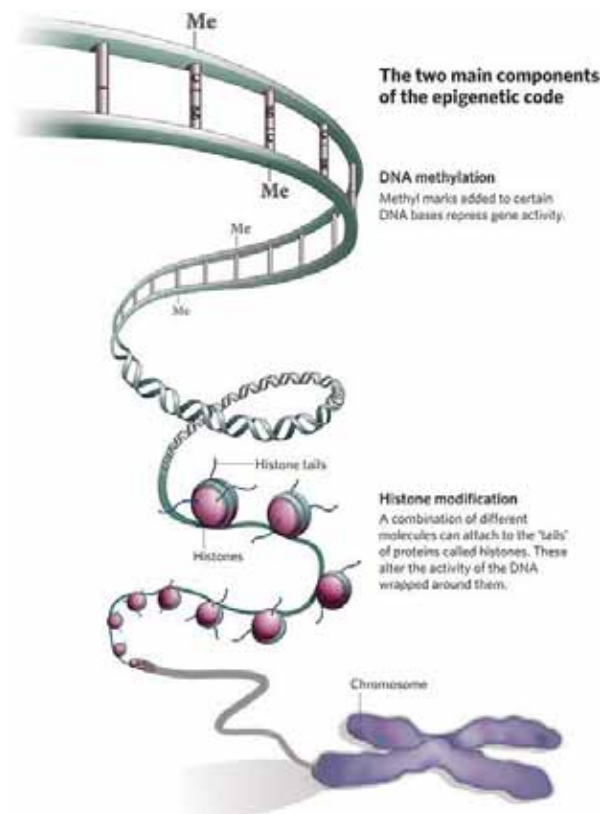
deprivació. Per això una teràpia amb inhibidors de la fosforilació en els residus tirosina seria una bona diana terapèutica en el càncer de pròstata (Guo, Dai et al. 2006).

Una altra alteració observada en més del 90% dels càncers de pròstata és la sobreexpressió de l'oncogen ETS, incloent ERG, ETV1, ETV5 i ETV6. El mecanisme més comú en la sobreexpressió és la fusió del gen ERG amb el 5'UTR de TMPRSS2 (regió altament regulada per AR) (Tomlins, Rhodes et al. 2005; Tomlins, Laxman et al. 2007).

## 1.4 EPIGENÈTICA

### 1.4.1 Introducció

Els esdeveniments epigenètics es defineixen com alteracions en l'expressió dels gens sense canvis en la seqüència codificada pel DNA que s'hereten mitjançant la divisió cel·lular i que són crucials per perpetuar l'especificitat de teixit (Waddington 1969). Es pensava que aquests factors actuaven al llarg del temps, però s'ha vist que són altament dinàmics, canviant cada pocs minuts. Els factors de transcripció, incloent el GR, el receptor d'estrògens (ER) i l'AR, interaccionen amb aquests mecanismes epigenètics de manera dinàmica per modificar la transcripció dels gens i contribuir així a processos fisiològics i patològics. El terme modern epigenètica inclou els mecanismes a llarg termini i els que provoquen canvis transitoris i dinàmics.



**Figura 11.** Mecanismes epigenètics. Extret de [Qiu J. Nature. 2006](#)

Els mecanismes epigenètics inclouen 3 tipus de regulació dels gens: 1) la metil·lació del DNA, 2) les modificacions postraduccionals de les histones (l'acetil·lació/desacetil·lació) i 3) alteracions en la regulació "feedback" dels factors de creixement (Nakayama, Lee et al.

2000; Nakayama, Watanabe et al. 2000; Nakayama, Sako et al. 2000; Cedar and Bergman 2009).

El primer mecanisme, la metilació del DNA (figura 11), interfereix en la transcripció. La metilació *de novo* té lloc només en cèl·lules somàtiques adultes. Una fracció de les illes CpG humanes és propensa a la metilació progressiva en alguns teixits durant el pas dels anys (Issa 2000), en cèl·lules anormals, com les canceroses (Herman and Baylin 2000) i en línies cel·lulars permanents (Antequera, Boyes et al. 1990).

Una petita proporció d'illes es metilen durant el desenvolupament fent que el promotor associat es silenciï (Jaenisch, Harbers et al. 1982).

El segon mecanisme de control transcripcional epigenètic és la modificació d'histones (figura 11). Estan subjectes a modificacions postraduccionals com l'acetilació, la metilació, la fosforilació i la ubiquitinació en les cues N-terminals (Zhang and Reinberg 2001). L'acetilació s'associa amb activació de la transcripció, mentre que la desacetilació s'associa amb silenciament transcripcional.

Tot i que les modificacions d'histones i la metilació del DNA són processos independents, estan molt lligats (Li 2002). Cooperen per reprimir la transcripció dels gens (Cameron, Bachman et al. 1999; Chen, Chen et al. 2003). Per exemple, les DNA metiltransferases (DNMTs) recluten les histones deacetilases (HDACs), donant lloc a la desacetilació d'histones i a la repressió transcripcional (Robertson, Ait-Si-Ali et al. 2000; Fuks, Burgers et al. 2001).

#### **1.4.2 Regulació epigenètica**

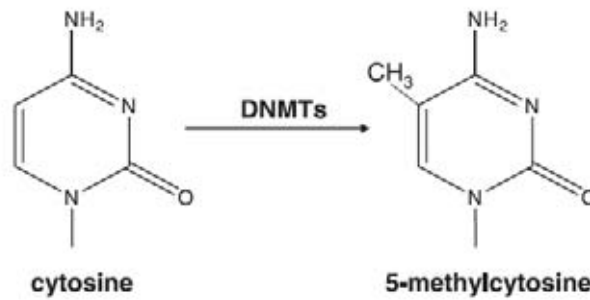
La regulació epigenètica transmet memòria dels estats de transcripció a través de la modificació d'histones, la remodelació de la cromatina a través dels complexos dependents d'ATP i la metilació del DNA. Aquestes marques epigenètiques donen canvis en l'accés dels factors de transcripció al DNA i així canvien la disponibilitat de la seqüència del promotor per activar o inhibir la transcripció, crucial per a l'activitat cel·lular. Els factors epigenètics exerceixen el seu efecte en la cromatina a través de diferents escales temporals, oscil·lant entre minuts en la senyalització a través de receptors hormonals, fins a generacions en el cas de *l'imprinting*. Aquest caràcter dinàmic de l'epigenètica té implicacions en diferents sistemes, entre ells, la reprogramació de cèl·lules mare o la regulació de càncers hormonodependents. Per això la interacció dinàmica entre els receptors hormonals i els

factors epigenètics es planteja com una diana per al tractament de malalties com la depressió i el càncer (Biddie and Lightman 2011). Els mapes del genoma epigenètic s'han generat per bastants tipus cel·lulars en ratolins i humans. Es pensa que el mecanisme de silenciament epigenètic juga un paper important en el desenvolupament de càncers humans, entre ells, el càncer de pròstata. La hipermetilació d'illes CpG en els promotors i la hipocetilació, realitzada per les DNMTs i les HDACs, respectivament, s'associen amb la repressió de la transcripció en diferents càncers (Bernstein, Kamal et al. 2005; Roth, Abnet et al. 2006; Barski, Cuddapah et al. 2007; Pan, Tian et al. 2007; Zhao, Han et al. 2007).

### 1.4.3 Metilació del DNA

La metilació del DNA és una de les modificacions epigenètiques més estudiades en organismes unicel·lulars i multicel·lulars. En cèl·lules animals, el DNA es modifica per l'addició d'un grup metil als residus de les citosines en els dinucleòtids CpG. En vertebrats, el DNA és metilat per les DNMTs, l'enzim responsable de catalitzar la transferència del grup metil des de la 5-adenosilmetionina (SAM) a la posició 5' d'una citosina adjacent a una guanina (CpG) per a formar una 5-metil-2-deoxicitidina (5-mC)(figura 12). La metilació del DNA *de novo* la realitzen els enzims DNMT3a i DNMT3b, i el manteniment de la metilació el realitza la DNMT1 (McGarvey, Greene et al. 2007).

La metilació en vertebrats està dispersa per tot el genoma (metilació global). Algunes seqüències CpG estan localitzades en zones del DNA anomenades illes CpG. Aquestes illes CpG són regions en el DNA de més de 200 nucleòtids on G + C sumen més del 50% dels nucleòtids (Rozenberg, Shlyakhtenko et al. 2008). La distribució de les parelles CpG en el genoma humà és restringida, excepte en les illes CpG, normalment localitzades en la regió promotora d'aproximadament el 60% dels gens (Gardiner-Garden and Frommer 1987) i que són típicament no metilades. Les anàlisis computacionals de la seqüència del genoma humà prediuen l'existència de 29.000 illes CpG (Lander, Linton et al. 2001; Venter, Adams et al. 2001).

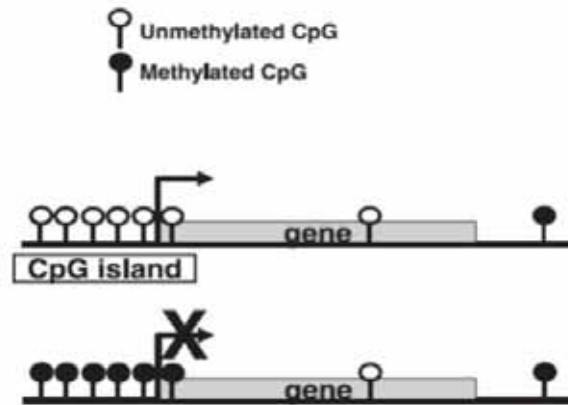


**Figura 12.** Mecanisme de metilació del DNA. Extret de (Chuang, Chu et al. 2007. *Pediatr Res.*)

La hipermetilació de les illes CpG s'associa amb la repressió de l'expressió dels gens *downstream* (Jones and Baylin 2002), possiblement per la interferència amb la unió dels factors de transcripció, o a través de l'acció de les proteïnes d'unió al DNA metilat (MBDs) (figura 13). La metilació inhibeix la unió dels factors de transcripció o la unió de les proteïnes metilcitosines (MECP 1 i 2), que interaccionen amb components estructurals de la cromatina, fent que el DNA sigui inaccessible als factors de transcripció a través de la desacetilació d'histones i canvis en l'estructura de la cromatina (Bird and Wolffe 1999).

La metilació del DNA és una marca de silenciament que no és fàcilment reversible. La metilació de les citosines contribueix a l'*imprinting*, la funció sinàptica neuronal, l'especificitat cel·lular, l'autisme i el càncer, per això s'ha considerat una memòria epigenètica estable, capaç d'heretar-se en les divisions cel·lulars durant generacions. Això pot tenir conseqüències en el caràcter, que involucren la senyalització dels receptors, com passa amb el receptor de glucocorticoides i l'estrès. Factors ambientals al principi de la vida poden alterar l'estructura de la cromatina epigenèticament quan són adults. Alguns estudis indiquen que els gens podrien entrar en un cicle de metilació – no metilació, modulant així la marca epigenètica mitjançant els factors de transcripció i respondre dinàmicament a senyals ambientals (Liu, Li et al. 2008).

La variabilitat en el patró de metilació porta a pensar en la possibilitat que diferents distribucions reflecteixin diferents funcions del sistema de metilació del DNA (Colot and Rossignol 1999) ja que no tots els parells CG potencialment metilables a l'illa són requerits per al silenciament del gen, i, a més a més, segments de DNA metilat poden silenciar a distància (Rideout, Eversole-Cire et al. 1994).



**Figura 13.** Les illes CpG es troben no metilades en els promotors dels gens. Quan es metilen de manera aberrant, silencien l'expressió dels gens que es troben *downstream*. Extret de Chuang et al., *Pediatr Res.*, 2007.

#### 1.4.4 Metilació del DNA i càncer

La metilació del DNA és un mecanisme de control important en cèl·lules normals. Si la metilació és inapropiada, es converteix en un mecanisme rellevant per al desenvolupament de la majoria de tumors (Esteller, Fraga et al. 2001).

Moltes CpG en teixit normal no estan metilades. El 80% dels dinucleòtids CpG no estan en illes CpG i estan altament metilats (eviten la transcripció de zones repetitives, la inserció de seqüències virals i transposons). Les illes CpG que romanen en els promotors estan majoritàriament desmetilades, permetent una transcripció activa dels gens. En càncer, el patró de metilació sovint és el contrari; les illes CpG es metilen, causant un silenciament transcripcional. Molts dels gens silenciats són gens supressors de tumors, fet que provoca el silenciament transcripcional d'aquests gens, inhibint la seva funció i permetent la proliferació cel·lular. Per contra, les regions metilades es desmetilen (Esteller, Fraga et al. 2001; Jones 2002).

Tot i que l'associació entre la metilació de les illes CpG del promotor i la disminució de l'expressió dels gens en cèl·lules canceroses estava ben definida, la relació entre DNA i la unió dels factors de transcripció no era clara. Amb estudis *high-throughput* amb microarrays de metilació (Wei, Chen et al. 2002; Wei, Balch et al. 2006) es va concloure que les seqüències de DNA metilades eren llocs enriquits d'unió de factors de transcripció en el

càncer d'ovari (Liu, Li et al. 2008). En el càncer de pròstata s'han trobat més de 30 gens silenciats epigenèticament (Li, Hussain et al. 2005). Alteracions epigenètiques, incloent la metilació de gens supressors de tumors clau, poden jugar un rol en la progressió del càncer de pròstata cap a un estat resistent a la castració.

La hipometilació pot restaurar les funcions normals dels gens que són crítics per a la diferenciació i la proliferació. La 5-aza-2-deoxicitidina (5-AZA), un inhibidor de la citosina metiltransferasa, va restablir la resposta a hormones en tumors de mama i de pròstata que expressaven nivells baixos andrògens o que eren insensibles als andrògens. L'eficàcia de la 5-AZA consistiria en fer reversible el silenciament dels gens (Sonpavde, Aparicio et al. 2007).

#### **1.4.5 Metilació de l'AR i càncer**

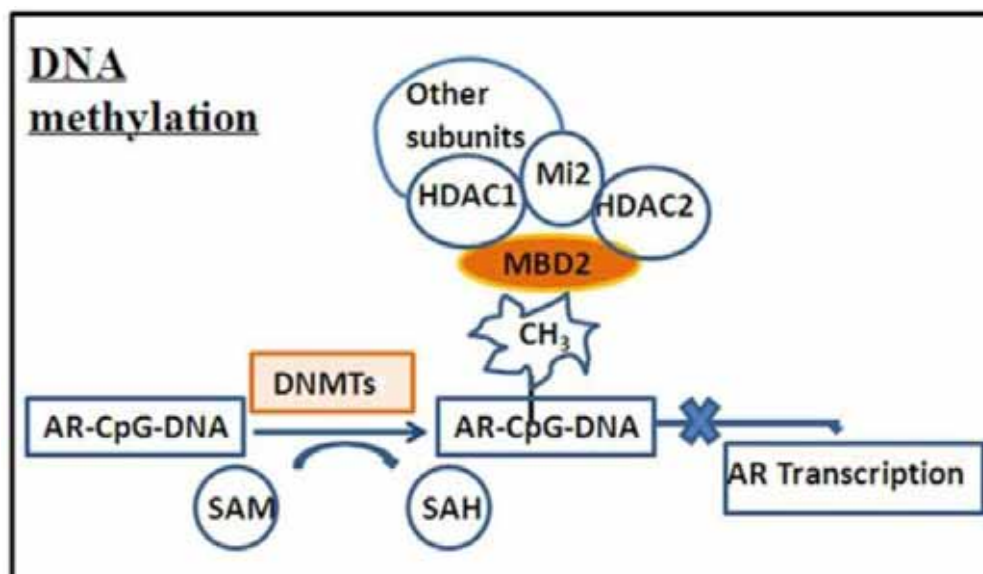
Els extrems 5' d'ER $\alpha$ , ER $\beta$ , PR i AR contenen zones riques en citosines (Kuiper, Faber et al. 1989; Hurtado, Pinos et al. 2008). La metilació selectiva o inactivació d'isoformes dels receptors està involucrada en la patogènesis del càncer de pròstata, que inicialment depèn de les hormones esteroidals. La teràpia hormonal és una àrea on la modulació epigenètica pot tenir un impacte significatiu en el creixement del tumor. Un component clau en la cascada de transducció dels andrògens és l'AR, i com que en el càncer de pròstata i en síndromes hormoninsensibles no es detecten defectes estructurals importants en el gen d'AR, (Culig, Klocker et al. 1993; Quigley, De Bellis et al. 1995), i alguns estudis han reconegut la hipermetilació com un mecanisme important de regulació de gens clau en el càncer de pròstata (Li, Hussain et al. 2005), la metilació del promotor de l'AR podria ser una de les causes del seu silenciament en el CRPC ja que AR es troba metilat en el 8% dels tumors de pròstata i no metilat en teixit normal (Sasaki, Tanaka et al. 2002)(figura 14).

En les línies cel·lulars de tumor de pròstata que no responen a andrògens s'ha detectat la metilació aberrant de les illes CpG a 5', que es correlaciona amb la pèrdua d'expressió de l'AR *in vitro*. El tractament amb l'agent desmetilant 5-AZA indueixen la reexpressió de l'AR i la seva funció (estudien els nivells d'expressió del PSA abans i després del tractament) (Jarrard, Kinoshita et al. 1998), demostrant que existeix una associació entre la metilació del promotor d'AR i la pèrdua de la seva expressió. Es creu, però, que la metilació del promotor d'AR és un efecte tardà en la carcinogènesi prostàtica (Sasaki, Tanaka et al. 2002).

En línies cel·lulars de leucèmia es va veure que el promotor de l'AR presentava illes CpG metilades i no metilades (20% de casos amb illes només metilades i el 80% de casos amb illes metilades i no metilades). El tractament amb 5-AZA augmentava l'expressió d'AR en totes les línies estudiades. La metilació aberrant d'AR en les cèl·lules hemotopètiques és una alteració en la leucèmia i podria ser molt útil clínicament com a marcador específic de tumors (Liu, Wang et al. 2009).

El promotor d'AR també s'ha trobat metilat en càncer d'endometri, així com també el promotor del PR-B, metilat en el 87% dels càncers d'endometri estudiats (Zhou, Dowdy et al. 2007).

En altres RN, la metilació no només s'associa a càncer; s'ha observat la metilació del GR com a mecanisme de regulació del caràcter (Thomassin, Flavin et al. 2001).



**Figura 14.** Les proteïnes DNMT1 i MBD2 són importants per al silenciament del gen d'AR. Extret de (Tian, Lee et al. 2012)

#### 1.4.6 Càncer i tractament epigenètic

Diferents estudis han demostrat que les cèl·lules canceroses tenen més concentració de DNMTs i estan subjectes a una metilació *de novo* anormal, i que aquest procés està lligat a la modificació d'histones.



Existeixen dos moduladors epigenètics vàlids per al tractament, les DNMTs i les HDACs. Els inhibidors d'aquests dos enzims reactiven gens silenciats de manera anormal en cèl·lules cancerígenes, incloent els gens supressors de tumors, els reguladors del cicle cel·lular i els receptors esteroidals (tots amb potencial activitat antitumoral). Entre aquests agents inhibidors hi ha la 5-AZA, un dels inhibidors de les DNMTs, i la Tricostatina A (TSA), un inhibidor de les HDACs (disminueix els nivells de mRNA de la DNMT3B)(Walton, Li et al. 2008).

Els inhibidors de les HDACs bloquegen l'activació transcripcional mediada per AR de molts gens, incloent TMPRSS2, involucrat en la fusió amb membres de la família ETS en la majoria de tumors de pròstata. La TSA augmenta l'activitat de l'AR (Welsbie, Xu et al. 2009).

Els promotors de ER $\beta$ , AR, PR-A i PR-B estan metilats fins i tot inactivats en algunes línies cel·lulars. Tractant-les amb 5-AZA es restaurava l'expressió de tots aquests gens dels receptors nuclears (Sasaki, Tanaka et al. 2002).

## **1.5 LA DIABETIS I EL CÀNCER DE PRÒSTATA**

La diabetis melitus (DM) i el càncer de pròstata són dues malalties importants que van en augment, afectant a milions d'homes a tot el món. S'han fet diferents estudis que relacionen aquestes dues malalties i en molts d'ells no diferencien entre diabetis tipus 1 (DM1) i tipus 2 (DM2), i perquè la DM2 és més comú que la DM1, la gran majoria de resultats fan referència a la DM2 i el càncer de pròstata (Pierce 2012).

La DM2 és una malaltia que provoca hiperglicèmia crònica (els valors de la glucosa en sang són de 126 mg/dL o superior (Naito, Asai et al. 2012) degut a la resistència a la insulina i a la deficiència relativa d'aquesta (Robbins and Cotran, Pathologic Basis of Disease, 7th Ed. pp 1194-1195.). És una malaltia multifactorial, causada per la interacció entre factors genètics i ambientals, així com també l'estil de vida. La incidència de la malaltia és la mateixa entre homes i dones, i augmenta amb l'edat. L'obesitat i l'edat avançada es relacionen amb l'augment de la incidència.

La DM s'ha associat amb un risc augmentat de patir nombrosos càncers, incloent el de pàncrees, fetge, tracte biliar, endometri, mama, ronyó, còlon, bufeta, esòfag i limfoma no hodgkinià. No obstant, altres estudis demostren que la DM comporta menys risc de patir càncer de pròstata (Grote, Becker et al.; La Vecchia, Negri et al. 1990; Everhart and Wright 1995; Hu, Henderson et al. 1999; Hu, Manson et al. 1999; Strickler, Wylie-Rosett et al. 2001; Grote, Becker et al. 2010). Per tant, existeix una associació inversa entre la DM2, iniciada majoritàriament a l'edat adulta, i el risc de patir un càncer de pròstata; aquest risc disminueix com més temps passa després del diagnòstic de la diabetis (Giovannucci, Rimm et al. 1997).

Els estudis fets en diferents poblacions suggereixen una associació inversa entre la DM i el risc de patir càncer de pròstata tot i tenir un nombre de mostres limitat (Kessler 1970; Henderson, Bogdanoff et al. 1974; Ragozzino, Melton et al. 1982; O'Mara, Byers et al. 1985; Thompson, Garland et al. 1989; La Vecchia, Negri et al. 1994). L'any 2006, Kasper i Giovannucci van publicar un metaanàlisi on estudiaven l'associació entre la DM i el càncer de pròstata. Comptaven amb el doble de casos de càncer de pròstata, però van arribar a la mateixa conclusió que els estudis previs: hi havia una associació inversa entre la DM i el risc de patir càncer de pròstata. En una revisió publicada recentment es dóna suport a aquesta associació inversa i, a més a més, s'associa la DM amb la disminució del risc de patir càncer de pròstata de baix i alt grau, tot i que l'associació és major en el grau baix (Pierce; Gong, Neuhaus et al. 2006; Kasper and Giovannucci 2006).

Una de les hipòtesis que explicaria perquè la DM disminueix el risc de patir càncer de pròstata es basa en la reducció en el sèrum de factors de creixement (insulina, IGF-1 i testosterona). La divisió de les cèl·lules de la pròstata és controlada per la testosterona i el càncer de pròstata primerenc és sensible als andrògens (Coffey, O'Sullivan et al. 1979). A més a més, en els animals del laboratori, s'ha associat la DM2 amb la reducció del número de cèl·lules de Leydig al testicle i amb una reducció de la secreció de testosterona, possiblement per un efecte directe i advers de la glicèmia i la insulinoresistència (Paz, Homonnai et al. 1978; Jackson and Hutson 1984; Pitteloud, Hardin et al. 2005). La disminució de la testosterona comporta un augment dels nivells d'estradiol independents de l'índex de massa corporal, que explicaria l'augment del risc de patir càncer de mama i endometri en la DM2 (Ding, Song et al. 2006). La insulina està associada amb el creixement de les cèl·lules

prostàtiques normals i tumorals, per tant, nivells baixos d'insulina podrien tenir efecte inhibitori en el creixement d'aquestes cèl·lules (Peehl and Stamey 1986; Polychronakos, Janthly et al. 1991; Hsing 2001; Hsing and Devesa 2001; Lehrer, Diamond et al. 2002).

Els individus que pateixen diabetis des de fa temps presenten nivells reduïts d'insulina circulant que s'associa a un baix risc de patir càncer de pròstata. Els canvis hormonal i metabòlics associats a la DM poden explicar aquesta relació temporal. Primer, els nivells d'insulina varien dramàticament: en els primers anys o estadis de la DM2 hi ha hiperglicèmia i hiperinsulinèmia degut a la insulinoresistència en teixits perifèrics. Passat un temps, quan la malaltia progressa, els nivells d'insulina decauen per sota dels nivells de les persones no diabètiques perquè hi ha dany i reducció de la massa de les cèl·lules  $\beta$  (Polonsky 1999). La insulina disminueix els nivells de IGFBP-3 que controla la fracció lliure de IGF-1, per això els nivells de IGF-1 són elevats al principi de la malaltia, però disminueixen amb el progrés d'aquesta (Clauson, Brismar et al. 1998). IGF-1 s'ha associat amb l'augment del risc de patir càncer de pròstata en diferents estudis (Stattin, Bylund et al. 2000; Chan, Stampfer et al. 2002). Els nivells sèrics d'insulina correlacionen negativament amb els nivells circulants de testosterona, DHT i SHBG, i correlacionen positivament amb la ratio T/SHBG (Haffner, Mykkanen et al. 2000; Hsing 2001). La relació de la diabetis amb el risc de patir càncer de pròstata és més accentuada entre els homes actius físicament (Calton, Chang et al. 2007); els nivells d'insulina circulant i de testosterona disminueixen amb l'activitat física, per això s'especulà en la possibilitat de què la diabetis previngui la iniciació del càncer de pròstata, però que tingui poc efecte o cap en la progressió d'aquest (Calton, Chang et al. 2007).

Els nivells de PSA en sèrum són menors en homes diabètics comparats amb els nivells d'homes no diabètics, però aquests nivells baixos només reflecteixen el 20% dels casos on s'ha associat inversament la DM2 i el càncer de pròstata (Wallner, Morgenstern et al.; Muller, Severi et al. 2009; Waters, Henderson et al. 2009; Wallner, Morgenstern et al. 2011). Com que el gen del PSA presenta AREs en el seu promotor (Monath, McCullough et al. 1995), i els homes diabètics tenen nivells baixos d'andrògens, semblaria que aquests nivells baixos de PSA serien el resultat de la poca activació transcripcional deguda als nivells baixos d'andrògens (Betancourt-Albrecht and Cunningham 2003).

S'ha postulat també que hi podria haver un lligam genètic entre la DM2 i el càncer de pròstata, ja que algunes variacions en el gen HNF1B (o TCF2), associat amb un alt risc de patir càncer de pròstata, confereix protecció contra la DM2. A més a més, Rebouissou i col·laboradors van postular que HNF1B podria ser un gen supressor de tumors en la pròstata, tal i com ho és el ronyó (Rebouissou, Vasiliu et al. 2005). Thomas i col·laboradors van trobar un possible segon locus en el gen JAZF1 implicat en el càncer de pròstata i la DM2, però les 2 variants no es correlacionaven (Thomas, Jacobs et al. 2008).

La inflamació de baix grau és un dels components de la DM2; s'ha observat uns nivells alts de TNF $\alpha$  en sèrum de pacients diabètics comparats amb els no diabètics (Olson, Callas et al. 2012). El TNF $\alpha$  podria jugar un paper important en la disminució dels nivells de SHBG i de testosterona en sèrum (Simo, Barbosa-Desongles et al. 2012; Simo, Barbosa-Desongles et al. 2012). Un *cross-talk* entre la inflamació i els nivells d'andrògens podrien ser un dels mecanismes per a disminuir el risc de patir càncer de pròstata en la DM2. A més a més, s'ha demostrat recentment que gens relacionats amb la inflamació s'associen als nivells d'andrògens en sèrum en homes (Meyer, Chu et al. 2012).

Com ja s'ha referenciat anteriorment, l'AR presenta un polimorfisme CAG en l'exó 1. La variació en la longitud d'aquests triplets s'ha associat a diferents malalties, entre elles, el càncer de pròstata. Per això Stanworth i col·laboradors, l'any 2008 van fer un estudi per comprovar si les repeticions del triplet CAG en l'AR eren un factor important per a la DM2. Els investigadors van concloure que no són un factor important per a la DM2, però no exclouen un possible rol dels polimorfismes d'AR en la malaltia (Stanworth, Kapoor et al. 2008).

Factors genètics i epigenètics determinen el destí cel·lular i la funció. Mitjançant la tecnologia del genotipatge s'han identificat més de 20 loci associats amb el risc de la diabetis tipus 2 (Sambuy 2007; Zhao, Li et al. 2009). Però tots els loci junts només expliquen menys del 5% dels riscos genètics de la diabetis. Els esdeveniments epigenètics s'han considerat com a factors que contribueixen en les malalties metabòliques (Kaput, Noble et al. 2007). Una dieta no sana i el sedentarisme porten a canvis epigenètics que poden contribuir al començament de la diabetis (Kaput, Noble et al. 2007).

## 1.6 EXISTÈNCIA DE PROMOTORS I DE PRIMERS EXONS ALTERNATIUS EN ELS RECEPTORS NUCLEARS.

### 1.6.1 El control de la transcripció.

La transcripció es produeix en diferents fases ben establertes i controlades mitjançant regions del DNA no codificants (regió reguladora o promotors), situades més a l'extrem 5' del punt d'inici de la transcripció (TSS). El promotor eucariota presenta dues parts:

- El promotor basal o *core promoter*, component bàsic per a la regulació requerida per iniciar correctament la transcripció mediada per la RNAPol II. Comprèn des de la posició -50 a +20 nt, respecte del TSS, i pot presentar diversitat estructural i funcional (Burley and Roeder 1996; Hampsey 1998; Lemon and Tjian 2000). És la regió mínima de DNA on s'uneix el complex de preiniciació (PIC), compostat per la RNAPol II i els factors de transcripció generals associats, que són TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF i TFIIH. Tot i les més de 40 proteïnes que formen el complex PIC, TFIID juga un paper important en el reconeixement dels elements específics del promotor basal per facilitar l'inici de la transcripció (Smale and Baltimore 1989; Smale 1997). Dins la seva seqüència conté elements de DNA com la caixa TATA, l'element iniciador (Inr), el *Downstream Core Promoter Element* (DPE) i el *TFIIB Recognition Element* (BRE), però no els acostuma a presentar simultàniament. La seva composició determina quin *enhancer* o activador s'hi unirà o no per cooperar amb el promotor (Ohtsuki, Levine et al. 1998; Rozenberg, Shlyakhtenko et al. 2008). La caixa TATA és important per la regulació dinàmica del gen mentre que els altres elements de la seqüència són importants per mantenir-ne l'expressió constitutiva (Struhl, Chen et al. 1985; Raser and O'Shea 2004).
- El promotor proximal és una seqüència situada més a l'extrem 5' del gen, que pot contenir elements reguladors addicionals (els *enhancers* o activadors, situats unes kilobases abans o després del punt d'inici de la transcripció), normalment amb influència més dèbil que el promotor basal. S'estén fins a -200 nt del TSS i conté els llocs d'unió dels factors de transcripció (TFBS), crítics pel reclutament de la RNAPol II

al DNA. Hi trobem seqüències com la caixa CCAAT o la caixa Sp1, que contribueixen a l'eficiència de l'inici de la transcripció (Rozenberg, Shlyakhtenko et al. 2008).

En mamífers existeixen dos models d'inici de la transcripció: mitjançant illes CpG (independent de la caixa TATA) amb múltiples TSS, o amb inici de la transcripció dependent de TATA, on el TSS està concentrat en un o pocs llocs consecutius en el genoma (Carninci 2007). Els promotors dirigits per la caixa TATA s'associen a expressió teixit específica o context específica mentre que els promotors CpG estan associats a gens *housekeeping* (Schug, Schuller et al. 2005; Carninci, Sandelin et al. 2006; Carninci 2007).

### **1.6.2 Promotors alternatius i el control de l'expressió gènica.**

La transcripció és un procés molt regulat per la combinació de múltiples factors de transcripció (TF) que s'uneixen al promotor. L'existència del nombre de gens humans amb més d'un promotor (promotors alternatius) permet la transcripció en diferents condicions. Els promotors alternatius (PA) normalment són responsables de l'expressió de gens específics de teixits o que s'expressen en un moment determinat del desenvolupament. L'anàlisi portada a terme l'any 2006 va determinar que el 58% d'unitats transcripcionals codificants per proteïnes presentaven 2 o més PA (Carninci, Sandelin et al. 2006). Dos anys més tard, Singer i col·laboradors van concloure que la mitjana del nombre de promotors per gen era de 3 (Singer, Wu et al. 2008). Els PA poden produir una àmplia varietat de trànscrits i proteïnes a partir d'un únic gen (Ayoubi and Van De Ven 1996; Hochheimer and Tjian 2003; Cooper, Trinklein et al. 2006; Kimura, Wakamatsu et al. 2006). L'ús de PA és un mecanisme per crear diversitat i flexibilitat en la regulació de l'expressió gènica. Es coneixen 3 mecanismes que donen més d'un mRNA a partir d'un únic gen: trànscrits primaris iniciats amb PA, diferents processos de finalització o processament postranscripcional de l'extrem 3', i *splicing* alternatiu del trànscrit primari. L'ús de múltiples promotors es pot combinar amb diferents possibilitats d'*splicing* (Ayoubi and Van De Ven 1996).

Els PA tenen un interès particular perquè la seva expressió aberrant s'ha associat a malalties, particularment al càncer (Bourdon, Fernandes et al. 2005), i presenten una alta freqüència en el genoma dels mamífers (Back, Ang et al. 2007; Tsuritani, Irie et al. 2007).

### 1.6.2.1 *Splicing* alternatiu

El número de gens humans sorprèn per ser molt semblant al d'altres espècies. No obstant, s'han descrit que el número de trànscrips de mRNAs humans expressats és molt més alt que el número de gens, suggerint un rol important de l' *splicing* alternatiu (AS) en la producció de complexitat. Walter Gilbert va proposar que diferents combinacions d'exons podrien ser conjuntament tallades i empalmades (*splicing*) produint isoformes alternatives de mRNA d'un gen (*alternative splicing* o AS) (Gilbert 1978). A principis dels 80, en eucariotes, ja s'havia descrit que el 5% dels gens presentaven AS (Sharp 1994) mentre que als inicis dels anys 2000, els estudis confirmaven una alta taxa d'AS en el genoma humà, amb un 40-60% dels gens que presentaven formes alternatives d'*splicing*, suggerint que AS era i és un dels components de la complexitat funcional del genoma humà (Brett, Hanke et al. 2000; Kan, Rouchka et al. 2001; Modrek, Resch et al. 2001). En un inici es pensava que molts processos d'AS es donaven en el 5'UTR. Posteriorment es va demostrar que entre el 70 i el 88% d'AS canviaven la proteïna (Modrek, Resch et al. 2001). A més a més, el 25% dels gens, segons estudis bioinformàtics, presentaven formes de poliadenilació alternatives, la qual cosa fa que hi hagi molts tipus d'isoformes de mRNA (Beaudoing, Freier et al. 2000). Una part important dels gens que pateixen AS estan implicats en senyalització i regulació (Modrek, Resch et al. 2001). L'AS del pre-mRNA afecta la majoria de gens humans i juga un paper important en el desenvolupament i la malaltia (Caceres and Kornblihtt 2002; Faustino and Cooper 2003; Musunuru 2003).

S'ha observat l'existència de PA i AS en l'extrem 5' dels exons en membres de la superfamília dels receptors hormonals esteroïdals (Evans 1988; Jeltsch, Turcotte et al. 1990; Piva and Del Senno 1993; Grandien, Backdahl et al. 1995).

### 1.6.3 Primers exons alternatius en els receptors nuclears

El gen del receptor de glucocorticoides (GR) és un exemple de receptors nuclears amb múltiples exons alternatius. El gen humà conté 8 exons que es tradueixen (de l'exó 2 al 9) i 9 primers exons alternatius no traduïts (Turner, Schote et al. 2006; Presul, Schmidt et al. 2007). El GR es troba distribuït de manera ubiqua i està implicat en processos fisiològics com

la regulació del creixement, l'homeostasi metabòlica, la funció immunitària, etc. El seu nivell d'expressió varia entre els diferents teixits. Cada un dels primers exons alternatius té el seu promotor, situat a la regió 5' adjacent del primer exó alternatiu (Cao-Lei, Leija et al.; Cao-Lei, Leija et al. 2011). Algunes de les isoformes presenten promotors alternatius que són susceptibles a la metilació, reprimint així l'expressió d'aquests trànscrits (Kalinyak, Dorin et al. 1987).

El receptor d'estrògens (ER) presenta en la pròstata dues isoformes, ER $\alpha$  i ER $\beta$ , però només la segona s'expressa en cèl·lules epitelials prostàtiques (Hurtado, Pinos et al. 2008). L'ER s'expressa en diferents teixits (Nilsson and Gustafsson 2002) i variants de l'ER $\beta$  s'han descrit en tumors (Hopp and Fuqua 1998).

Existeixen dues isoformes del receptor de la progesterona (PR), PR-A i PR-B, que es diferencien en 164 aminoàcids de la regió N-terminal (li manquen a PR-A). Ambdues isoformes són codificades pel mateix gen, però són regulades per promotors diferents o alternatius. PR-B actua com un fort activador transcripcional mentre que PR-A actua com un inhibidor. Totes dues són essencials per al desenvolupament correcte de la glàndula mamària (Mulac-Jericevic, Lydon et al. 2003). La ratio PR-A:PR-B en tumor de mama afecta el pronòstic clínic (Hopp, Weiss et al. 2004). L'any 2007 es va veure que funcionaven de manera diferent en funció del lligand que s'unia el PR (Leo and Lin 2008).

El receptor d'andrògens presenta les variants AR-A i AR-B, que donen lloc al mateix trànscrit i a la mateixa proteïna, i la isoforma AR45, amb un patró d'expressió més restringit i diferent de l'AR de 110 KDa (Ahrens-Fath, Politz et al. 2005). AR45 s'ha descrit en l'apartat 1.3.4 d'aquesta tesi.



## 1.7 MODELS CEL·LULARS I ANIMALS

Per a estudiar el tumor de pròstata s'han utilitzat diferents propostes, entre les quals les línies cel·lulars derivades de tumor primari o de metàstasi i els models animals.

### 1.7.1 Models cel·lulars utilitzats en el càncer de pròstata

Existeixen diferents línies cel·lulars de càncer de pròstata, però les més utilitzades han estat les LNCaP, les PC3 i les DU145. Totes tres deriven d'una metàstasi de càncer de pròstata a diferents òrgans. La línia cel·lular LNCaP és una línia de càncer de pròstata positiva pel receptor d'andrògens (AR) (Whitaker, Hanrahan et al. 2004) que prové d'un aspirat de metàstasi al nòdul limfàtic supraclavicular d'un home de 50 anys (Horoszewicz, Leong et al. 1980). Són aneuploides i contenen alts nivells de la mutació T877A en l'AR, però segueixen sent sensibles als andrògens (Culig, Hoffmann et al. 1999) i la seva proliferació està regulada de manera dosi-dependent per la 5 $\alpha$ -DHT (Horoszewicz, Leong et al. 1983), que indueix la producció de la fosfatasa àcida i del PSA en el cultiu cel·lular (Horoszewicz, Leong et al. 1983; Lee, Sutkowski et al. 1995). Els tumors que responen a andrògens i les LNCaP comparteixen trets comuns com l'expressió d'AR i de PSA, estimulació de la proliferació a través dels andrògens *in vitro*, formació de tumor en ratolins mascles i aturada en el creixement tumoral després de la retirada d'andrògens (Horoszewicz, Leong et al. 1983; Sonnenschein, Olea et al. 1989; Montgomery, Young et al. 1992; Veldscholte, Berrevoets et al. 1992; Berchem, Bosseler et al. 1995). La línia cel·lular PC3 deriva d'una metàstasi òssia d'un adenocarcinoma de grau IV d'un home de 62 anys. És una línia hormonoindependent (Kaighn, Lechner et al. 1980). Les DU145 són una línia cel·lular que no respon a hormones i prové d'una metàstasi a cervell d'un adenocarcinoma prostàtic d'un home de 69 anys (Mickey, Stone et al. 1980). Existeixen altres línies cel·lulars, com les PZ-HPV-7 (PZ-HPV-7 ATCC CRL-2221™) o les MDA PCa 2b (MDA PCa 2b ATCC CRL-2422™), però són menys utilitzades pels requisits especials de creixement en cultiu que presenten (Hara, Nakamura et al. 2003).

### 1.7.2 Models animals utilitzats en el càncer de pròstata

Els models animals són molt útils en la investigació ja que ens permeten estudiar amb més precisió l'origen i/o evolució de les malalties. Per estudiar el càncer de pròstata s'han utilitzat diferents alternatives i/o models animals, però fins fa poc el trasplantament de teixit prostàtic tumoral en ratolins nusos no havia tingut èxit, i si s'aconseguia, l'intent de crear un model consistent fracassava a l'hora de mantenir-lo durant els trasplantaments. Amb els models de *xenografts* ens trobàvem davant d'una situació semblant, degut a la diferència anatòmica entre la pròstata murina i la humana, a les variables metodològiques d'arrelament del tumor en el xenotrasplantament i també per la dificultat en la identificació i trasplantament de cèl·lules a la pròstata dorsal.

S'han generat models utilitzant diferents mecanismes, com la transgènesi en el cas dels ratolins TRAMP (Transgenic Adenocarcinoma of Mouse Prostate)(Greenberg, DeMayo et al. 1995), el *knock-out* de diferents gens [com el model murí de *knock-out* específic de pròstata de Pten, on el tumor progressa de PIN a adenocarcinoma invasiu i metastàtic (Wang, Gao et al. 2003), o nuls per p27, per exemple], i s'han creat també models murins a través d'injecció (ortotòpica o no) de línies cel·lulars derivades del càncer de pròstata com CWR22, LAPC, LuCAP (Wainstein, He et al. 1994; Royai, Lange et al. 1996; Stearns, Ware et al. 1998) o l'expressió forçada d'oncogens com RAS o BCL2 mitjançant vectors.

S'ha vist també que algunes soques de rata desenvolupen la malaltia de manera espontània: les Dunning R-3327 (Dunning 1963), les rates Noble (NR) (Noble 1977) i les Lobund-Wistar (Pollard 1973) i el 5% de les rates ACI/seg, que als 24 mesos d'edat desenvolupen carcinoma prostàtic amb capacitat metastàsica (Isaacs 1984).

Al grup de la Dra Marie-France Poupon de l'Institut Pasteur (París) van posar a punt un model, el PAC-120 (prostate AdenoCarcinoma 120)(figura 15), que consisteix en un *xenograft* de tumor prostàtic humà procedent d'una ressecció transuretral d'un pacient amb adenocarcinoma prostàtic recurrent però localitzat (de Pinieux, Legrier et al. 2001). La mostra de tumor no presentava teixit necròtic ni connectiu. Aquest tumor sí



**Figura 15.** Fotografia d'un PAC120

és trasplantable en ratolins nusos, on hi creix localment (es van fer fragments de 5x5 mm i es van trasplantar en ratolins *Swiss nu/nu (nude)* tal i com es detalla en l'apartat de materials i mètodes.

És un tumor hormonodependent, però es pot inhibir el seu creixement mitjançant la utilització d'antagonistes de l'hormona alliberadora de gonadotropina (FE200486)(de Pinieux, Legrier et al. 2001) o bé mitjançant castracions quirúrgiques; amb el temps, però, el tumor es torna hormono-resistent. Per tant, és un bon model per estudiar el mecanisme de l'hormono-resistència. El PAC-120 presenta el mateix immunofenotip que el tumor original (positiu per keratines, vimentina, PAP i Leu-7) i expressa els gens de HOXB9, HOXA4, HER-2/Neu i del PSA. Tot i que no s'han observat metàstasis en aquest model, mitjançant RT-PCR s'ha detectat l'expressió de transcrits humans a pulmó (de Pinieux, Legrier et al. 2001). S'ha trasplantat durant 13 anys i durant aquest temps el tumor ha patit poques alteracions entre el 5è i el 47è passatge. S'han obtingut 4 variants hormonoindependents del PAC120, de les quals cap ha presentat mutacions en el receptor d'andrògens (Legrier, Guyader et al. 2009).

### **1.7.3 Model experimental en la DM2**

La DM2 està caracteritzada per un grau d'hiposecreció d'insulina i una major contribució de la resistència a l'acció de la mateixa en diferents teixits i òrgans (Alberti 1999). Existeixen models animals espontanis (perquè expressen alteracions genètiques) o induïts al laboratori (Clifford J, Flatt R. 1998) de la DM2. Els models espontanis presenten inicialment una hiperglicèmia moderada però es transforma en severa, acompanyada d'hiperinsulinèmia, pèrdua de pes, i alguns cops, cetosi. Poden requerir insulina eventualment.

Els models induïts s'obtenen per l'administració de la estreptozotocina (STZ), un antibiòtic produït per una soca de *Streptomyces achromogens*, s'utilitza per induir la diabetis en animals experimentals i per al tractament de neoplasmes de pàncrees (IARC1978). És una metilnitrosurea, un anàleg de la glucosa que té un efecte tòxic en les cèl·lules  $\beta$  adultes en moltes espècies (Like and Rossini 1976; Tuch, Turtle et al. 1989). Com que la STZ és alcalina, causa trencament de la cadena de DNA que activa la poli(ADP-ribosa) sintasa, que provoca una deprivació letal del dinucleòtid nicotinamida adenina (NAD) en les cèl·lules  $\beta$  (Okamoto 1985).

## **2. HIPÒTESIS I OBJECTIUS**

---



Les dues hipòtesis que volíem demostrar en el present treball eren les següents:

- 1) La teràpia de la supressió hormonal aplicada en el càncer de pròstata provoca metilació de les illes CpG del receptor d'andrògens (AR).
- 2) L'existència de primers exons alternatius d'AR podria posar-se en evidència després del silenciament de l'AR de 110KDa.
- 3) La disminució de l'expressió d'AR podria ser una de les causes que fan que els pacients amb diabetis melitus tinguin menys risc de patir càncer de pròstata.

Per això el treball realitzat en la tesi doctoral ha estat destinat a demostrar els següents objectius:

- a) Esbrinar el paper de la metilació en el procés de l'hormonoresistència en el càncer de pròstata, identificant la metilació en les illes CpG del promotor d'AR durant la supressió androgènica.
- b) Caracteritzar el gen del receptor d'andrògens (AR) i els seus diferents trànscrits a la pròstata humana.
  - a. Caracteritzar els diferents inicis de transcripció i els possibles promotors alternatius d'AR.
  - b. Identificar els diferents trànscrits presents en la pròstata humana, en línies cel·lulars tumorals de càncer de pròstata i en altres línies cel·lulars.
  - c. Analitzar la influència de la metilació dels promotors (illes CpG) en l'expressió dels trànscrits d'AR.
- c) Caracteritzar la proteïna d'AR en pròstata humana, en línies cel·lulars de carcinomes prostàtics, en altres línies cel·lulars i en el model de *xenograft* PAC120
  - a. Identificar i caracteritzar els diferents inicis de traducció en els diferents trànscrits com també el pes molecular de les diferents isoformes.
  - b. Caracteritzar la localització subcel·lular de les diferents isoformes de la proteïna AR.
- d) Esbrinar les causes que fan que el càncer de pròstata tingui una menor incidència en els individus que pateixen diabetis melitus.

- a. Analitzar quin o quins són els factors que protegeixen de patir el càncer de pròstata (la insulina, la glicèmia, citocines i/o el silenciament o la disminució de l'expressió de l'AR) en pacients amb DM.
- b. Determinar quina o quines són les vies de senyalització responsables de l'efecte protector de la diabetis en el càncer de pròstata.

## 3. MATERIALS I MÈTODES

---





## 3.1 LÍNIES CEL·LULARS

### 3.1.1 Cèl·lules

Per a fer els diferents experiments s'han utilitzat les següents línies cel·lulars de mamífer:

- LNCaP-FGC: aquesta línia cel·lular prové d'un nòdul limfàtic supraclavicular, procedent d'un individu caucàsic de 50 anys (grup sanguini B+) amb diagnòstic confirmat de carcinoma de pròstata metastàtic. L'estimulació amb  $5\alpha$ -DHT modula el creixement i la producció de la PAP en aquest tipus cel·lular (Horoszewicz, Leong et al. 1980). Es van adquirir a *American Type Culture Collection* (ATCC).
- PC3: prové d'una metàstasi òssia de grau IV d'un adenocarcinoma de pròstata en un individu de raça caucàsica de 62 anys. Aquesta línia cel·lular és androgen – independent (no respon a tractaments pro o antiandrogènics) i presenta escassa activitat de les proteïnes PAP i  $5\alpha$ -reductasa. És de morfologia epitelial i forma una monocapa en el flascó de cultiu (Kaighn, Lechner et al. 1980). Es van adquirir a l'ATCC.
- DU145: va ser aïllada per K.R. Stone d'una metàstasi cerebral d'un carcinoma prostàtic en un individu de raça caucàsica de 69 anys, que presentava un historial de 3 anys de leucèmia limfocítica. És una línia cel·lular hipotriploide, que expressa molt dèbilment la PAP i no expressa el PSA (Mickey, Stone et al. 1980). Es van adquirir a l'ATCC.
- MDA-PCa2b: línia cel·lular establerta a partir d'una metàstasi a os d'un home de 63 anys de raça negra, amb un adenocarcinoma de pròstata androgen-independent. La línia cel·lular expressa el PSA i l'AR, i és androgen sensible.

El RNA i la proteïna van ser cedits amablement per Marta Garcia, del grup del Dr. Reventós del Vall d'Hebrón Institut de Recerca (VHIR).

- PZ-HPV-7: deriva de cèl·lules epitelials cultivades a partir d'un teixit de zona perifèrica de pròstata normal, procedent d'un individu caucàsic de 70 anys (Weijerman, Zhang et al. 1998).
- HepG2: aquesta línia prové d'un carcinoma hepàtic extret d'un individu caucàsic de 15 anys d'edat. És de morfologia epitelial i expressa proteïnes com protrombina, fibrinogen i  $\alpha$ -fetoproteïna (<http://www.hepg2cells.com>).
- HeLa: les cèl·lules HeLa constitueixen un llinatge de cèl·lules epitelials humanes procedents d'un carcinoma cervical, i les primeres cèl·lules humanes de les quals s'establí un llinatge cel·lular permanent. El 1951 es practicà una operació quirúrgica a la pacient Henrietta Lacks (d'aquí el nom), una dona afroamericana de 31 anys, a la qual s'extraïeren cèl·lules d'un carcinoma de l'úter amb la intenció d'avaluar-ne la malignitat. Les cèl·lules extretes foren envaïdes pel virus del papil·loma humà 18 (HPV18), transformant-se en cèl·lules tumorals. (Scherer, Syverton et al. 1953; Lucey, Nelson-Rees et al. 2009).
- CW9019 i RH30: són dues línies cel·lulars de rabdomiosarcoma ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)); el RNA de les línies esmentades va ser amablement cedit pel Dr. Josep Roma del grup d'Oncologia Pediàtrica del VHIR.
- Hek293: aquesta línia cel·lular prové de cèl·lules embrionàries de ronyó humà (HEK, Human Embryonic Kidney cells) que van ser transformades amb DNA adenoviral tipus 5 (Graham, Smiley et al. 1977).

Les línies MDA-MB-468 (adenocarcinoma), BT474 (carcinoma ductal) i T47D (carcinoma ductal, AR positiu) són línies cel·lulars de càncer de mama cedides pel Dr. Scaltriti, investigador del VHIO (Vall d'Hebrón Institut d'Oncologia).

Els RNAs de les línies cel·lulars cedits per tots els investigadors es van quantificar i es va analitzar la qualitat de la mateixa manera que per la resta de les línies, tal i com s'especifica en l'apartat 3.3.1.1.

### **3.1.2 Condicions de cultiu**

Tots els cultius cel·lulars han estat crescuts i mantinguts a 37 °C en un incubador amb una humitat relativa del 99% i al 5% de CO<sub>2</sub> seguint els protocols normalitzats de treball per a condicions estèrils en la sala de cultius.

El medi RPMI 1640 (PAA Laboratories, Pasching, Àustria) es va utilitzar tant per a les línies LNCaP, PC-3 i DU145 mentre que per a les PZ-HPV-7 es va utilitzar el medi Keratinocyte-SFM (Invitrogen-Life technologies, Carlsbad, CA, USA), i per a les HeLa, HepG2 i Hek293 es va utilitzar medi DMEM (PAA Laboratories). Tant el RPMI com el DMEM es van complementar amb sèrum fetal boví (de l'abglès *fetal bovine serum* o FBS)(PAA Laboratories) al 10%, 5000U de penicil·lina, 50 mg de penicil·lina i d'estreptomicina (P/S solution, Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel), 10mM de piruvat sòdic (Biological Industries) i 0,1 mM d'aminoàcids no essencials (MEM-Eagle Non-essential-aminoacids, PAA Laboratories). El medi Keratinocyte es va complementar amb 2,5 µg d'EGF (Invitrogen-Life-Technologies) i 25mg d'extracte de pituitària bovina (Bovine pituitary extract, Invitrogen-Life technologies).

La descongelació de les diferents alíquotes cel·lulars es va realitzar mitjançant una immersió dels criotubs (Nunc, Thermo Fischer Scientific, Roskilde, Denmark) en un bany a 37°C per a sembrar-les posteriorment en els flascons i/o plaques més adients segons l'experiment. Aquests flascons podien ser o bé T30 o T75, i les plaques, o bé P60 o P100, tots ells de *Nunc*. Les diferents línies cel·lulars es van mantenir en el cultiu amb els respectius medis fins que van arribar a una confluència del 80% o fins a la fi de l'experiment. Per a subcultivar-les es

van desagregar del plàstic mitjançant el tractament amb Tripsina-EDTA (0,5mg/mL tripsina, 0,22mg/mL EDTA)(PAA) a 37°C, es van centrifugar a 1400 rpm durant 5 minuts i es van resuspendre fent la dilució adequada amb el medi corresponent per a realitzar l'experiment, després d'haver fet el comptatge (Countess® Automated Cell Counter; Invitrogen). La conservació de les línies cel·lulars es realitzà per congelació progressiva d'alíquotes de  $1,5 \times 10^6$  cèl·lules en els respectius medis amb el 10% de DMSO (Dimethyl sulfoxide  $\geq 99,7\%$ , Hybri-Max®, sterile-filtered, hybridoma tested, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Aquesta congelació progressiva consistia en guardar les cèl·lules durant 24h a  $-80^\circ\text{C}$ , i posteriorment, transferir-les al nitrogen líquid.

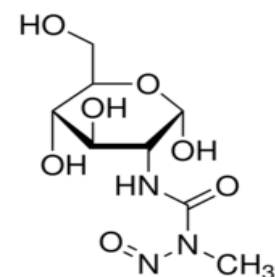
### 3.1.3 Tractament cel·lular

#### - *Charcoal*

Per tal de deprivar la línia cel·lular LNCaP d'hormones es va tractar el sèrum amb *charcoal*, (Charcoal, Dextran Coated, Sigma-Aldrich), un carbó actiu utilitzat per segrestar les hormones del sèrum. El fet que estigui recobert per dextrà fa que hi hagi menys pèrdua de proteïnes del sèrum sent així més específic per a les hormones. En el cas de les LNCaP es van sembrar amb el medi RPMI complementat amb el 7% de sèrum deprivat d'hormones (7% *Charcoal Stripped*–FBS (CS-FBS)) durant 10 dies, mentre que les LNCaP en condicions control es van créixer amb RPMI suplementat amb al 10% FBS, tenint en compte sempre no sobrepassar el 80% de confluència en el cultiu.

#### - Estreptozotocina (STZ)

La STZ (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) (figura 16) és un compost químic particularment tòxic per a les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques (productores d'insulina) en mamífers. És una glucosamina-nitrosourea i com altres compostos nitrosoureus és tòxica per les cèl·lules perquè els hi causa dany al DNA (accelera l'activació de la poli(ADP-ribose sintasa) seguit de la depleció letal de NAD (de l'anglès, nicotilamide adenine dinucleotide). La STZ és prou similar a



**Figura 16.** Estructura química de la STZ.

la glucosa per a ser transportada dins la cèl·lula pel transportador de glucosa GLUT2, però no per altres transportadors de glucosa, la qual cosa explica la seva especificitat i toxicitat en les cèl·lules  $\beta$ , ja que aquestes tenen nivells alts de GLUT2 (Schnedl, Ferber et al. 1994; Wang and Gleichmann 1998).

Per a descartar qualsevol efecte tòxic de la STZ sobre les cèl·lules epitelials del tumor de pròstata, es tractaren les LNCaP a 3 concentracions diferents de STZ (100 nM, 1 $\mu$ m i 10 $\mu$ m) i també amb el tampó citrat 50 mM a pH 4'5, vehicle de la STZ.

Aquestes cèl·lules es mantingueren en cultiu durant 10 dies, canviant el medi i fent fotografies diàriament per comprovar que no hi havia ni canvis morfològics ni mortalitat cel·lular deguts al tractament.

#### - Glucosa

En els experiments realitzats *in vitro* per mimetitzar els efectes de la diabetis en el càncer de pròstata, es van créixer les LNCaP amb RPMI al 10% FBS i a 30 mM de D-glucosa durant 5 dies. Per a les condicions control o de normoglicèmia es van créixer les cèl·lules a 5 mM de D-glucosa durant el mateix període de temps. A més a més, es van créixer també a 10 i 20 mM de D-glucosa, sempre en RPMI al 10% FBS, per veure l'efecte de l'augment de la concentració de glucosa. Cada dia es va canviar el medi a les cèl·lules per mantenir la concentració de glucosa constant.

Per a evitar qualsevol interferència de l'efecte osmòtic en els resultats es van tractar les cèl·lules amb L-glucosa, que no pot ser metabolitzada per aquestes. Per a fer aquests experiments es van créixer les LNCaP a 5 mM de D-glucosa i es va anar afegint la L-glucosa fins arribar a una concentració final de 30 mM de glucosa en el medi. Així doncs, en aquest cas, es tractaren les cèl·lules amb 5 mM de D-glucosa i amb 25 mM de L-glucosa.

En aquests experiments també es van fer fotografies de les cèl·lules per comprovar que no hi havia canvis morfològics.

- Insulina

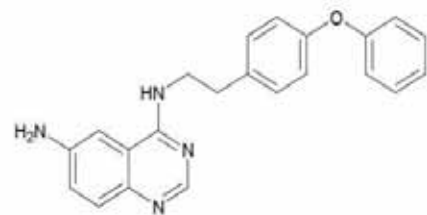
En els experiments referents a la diabetis es van créixer les LNCaP mantingudes a 5 mM de glucosa i es van tractar amb insulina (Sigma) a 20, 100 o 200  $\mu$ UI/mL durant 4 dies, canviant el medi (RPMI 10% FBS més la insulina) diàriament.

- Tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ )

Les LNCaP crescudes a diferents concentracions de D-glucosa es van tractar amb TNF $\alpha$ , una citoquina que estimula la fase aguda de la reacció inflamatòria, a 50 ng/mL durant 4 dies canviant medi cada dia.

- N4-[2-(4-fenoxifenil)etil]-4,6 quinazolidinamina (QNZ)

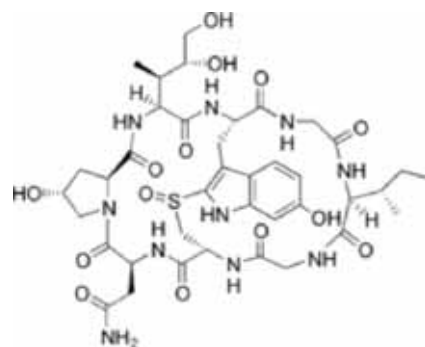
Inhibeix l'activació del factor de transcripció NF -  $\kappa$ B i s'utilitza per investigar la via de senyalització de l'esmentat factor de transcripció. Es van tractar amb QNZ (figura 17) les LNCaP crescudes a 5 i 30 mM de glucosa, amb i sense TNF $\alpha$ . La durada del tractament va ser de 4 dies a una concentració de 25 nM.



**Figura 17.** Estructura química del QNZ.

-  $\alpha$ -amanitina

El compost alfa-amanitina (figura 18) és un pèptid no ribosomal cíclic de vuit aminoàcids. És una de les toxines del grup amatoxines més letals, trobades en diverses espècies del gènere de fongs amanites, com en *Amanita phalloides* i *Amanita virosa*. L' $\alpha$ -amanitina és un inhibidor de la RNA polimerasa II, el que fa que sigui un verí letal en animals. Es van tractar les LNCaP amb una dosi de 50  $\mu$ g/mL durant 0, 2, 4, 6, 8 i 24 hores per tal de veure la vida mitjana de les isoformes d'AR identificades.



**Figura 18.** Estructura química de l' $\alpha$ -amanitina.

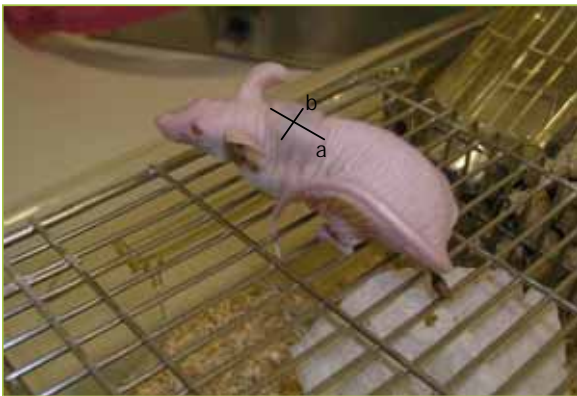
### 3.1.4 Transfecció transitòria de les línies cel·lulars

Les línies cel·lulars transfectades van ser les HeLa i les LNCaP. Per a fer-ho, el procediment a seguir va ser sembrar les cèl·lules en plaques de 100 mm (P100) de tal manera que al cap de 24 hores d'haver estat sembrades la confluència fos del 70% aproximadament. Un cop passat aquest temps, es va realitzar la transfecció amb el kit *Fugene 6* (Roche Molecular Biochemicals) segons les instruccions del proveïdor. Vint-i-quatre hores després de la transfecció es va canviar el medi corresponent a cada línia; entre 48 i 72 hores després de la transfecció es van recollir les cèl·lules per a l'extracció proteica.

Per al siRNA es va fer la transfecció seguint els passos del proveïdor.

## 3.2 MODELS ANIMALS

### 3.2.1 Model animal PAC120



**Figura 19.** Fotografia d'un animal amb el *xenograft* de càncer de pròstata implantat. S'hi detallen els eixos per mesurar el volum.

El model animal de *xenograft* de càncer de pròstata PAC120, amablement cedit per la Dra. Poupon, es va mantenir segons les indicacions descrites a *de Pinieux et al., 2001* (de Pinieux, Legrier et al. 2001). Els ratolins utilitzats per a realitzar els experiments van ser *swiss nude nu/nu* (Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA) de 5-6 setmanes d'edat a l'arribada; van ser estabulats a la zona lliure de patògens SPF (de

l'anglès, *Single Patogen Free*) de l'estabulari del VHIR, a Barcelona. Se'ls va proporcionar menjar i beure *ad libitum*. Tant el control dels animals com els procediments quirúrgics es van realitzar a la sala de manipulació de la SPF de l'estabulari. Aquests últims es van realitzar sempre sota anestèsia inhalatòria d'isoflorà al 2% (Forane, Abbott, Illinois, EUA) i col·locats



sobre una talla estèril la qual estava sobre una manta tèrmica per mantenir la temperatura corporal dels ratolins durant l'operació. Per evitar la ceguera que pot causar l'isoflorà, als ulls se'ls hi va aplicar Methocel (Colorcon, Inc., West Point, PA), un gel fet a partir de polímers de cel·lulosa. Just després de la cirurgia se'ls hi va aplicar analgèsia (Meloxicam, 0'5mg/ml).

Al realitzar el seguiment periòdic dels ratolins es va comprovar el pes de l'animal, l'activitat i l'aspecte d'aquest, i també el volum del tumor. La mesura del volum tumoral es va fer amb un peu de rei seguint la fórmula descrita a *de Pinieux et al., 2001* (de Pinieux, Legrier et al. 2001). Aquesta consistia en mesurar en creu el tumor i aplicar el quadrat del valor major de la mesura; un cop teníem aquest valor, es calculava el producte d'aquest valor amb la mesura de menor valor del tumor i es dividia entre 2, obtenint així el volum del tumor, en  $\text{cm}^3$  ( $V=(a^2 \cdot b)/2$ )(figura 19). Quan el volum del tumor superava el permès pel Comitè Ètic d'Animals (CEA), o quan l'animal presentava algun problema detectat en el seguiment setmanal, es sacrificava. Per a fer-ho, es va utilitzar la dislocació cervical després de sedar-los breument amb isoflorà.

Per a la resta de paràmetres es van seguir les normes estipulades per l'estabulari del VHIR (taula 1). Aquestes normes o directrius estaven basades en un sistema numèric on se li donava una puntuació a cada paràmetre a tenir en compte per controlar l'estat de l'animal segons l'observació feta; s'atorgava la puntuació més alta a una pitjor valoració dels paràmetres mencionats. Quan la suma d'aquests valors excedia el valor determinat pel CEA, es sacrificava l'animal.

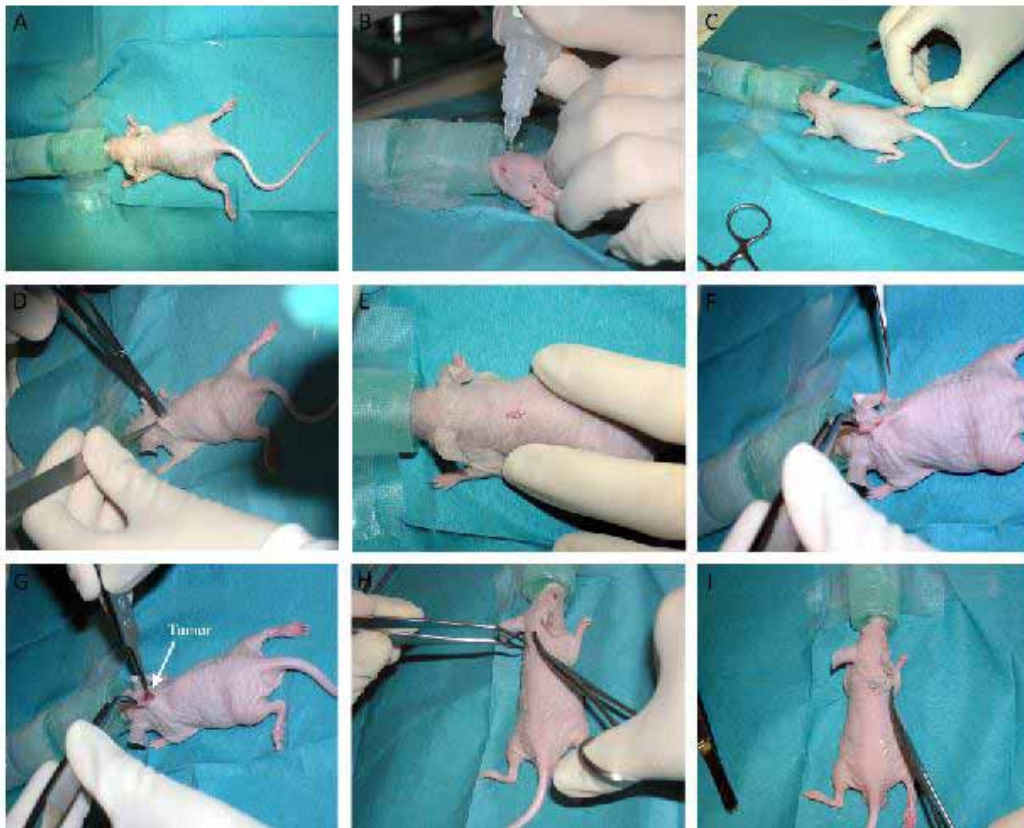
El manteniment rutinari dels animals (menjar, beure, neteja de les gàbies, revisió veterinària, etc.) va estar a càrrec del personal de l'estabulari del VHIR.

Paràmetre	Indicacions		Puntuació		Freqüència
<b>Pes (de 0 a 3)</b>	Normal (no hi ha pèrdua de pes o l'animal creix normalment)		0		2 cops per Setmana
	Pèrdua de pes inferior al 10%		1		
	Pèrdua de pes entre 10 i 20%. Possible alteració en l'aspecte o quantitat de la femta.		2		
	Pèrdua de pes superior al 20%. L'animal no consumeix aigua ni aliment		3		
<b>Observació de l'animal</b>	Aspecte	Normal	0		Diari
		Pell resseca, escamosa	1		
		Pell en mal estat i/o presència de secrecions oculars o nasals.	2		
		Postura anormal.	3		
	Automutilacions o vocalitzacions estranyes indicatives de dolor (0 ó 3)		SÍ	3	
			NO	0	
<b>Conducta en resposta a estímuls</b>	Molt agressiu o comatós (0 o 3)		SÍ	3	Diari
			NO	0	
<b>Control volum tumoral (subcutani)</b>	Tumor >1/10 del pes del ratolí (Calibrador Vernier < 0,5-1 cm <sup>3</sup> )		SÍ	3	1 cop per Setmana
			NO	0	
<b>Control dolor i possible administració d'analgèsia</b>	Comportament normal		0		2 cops per Setmana
	Animal es manté quiet un període de temps curt		1		
	Arqueig de l'esquena, pujada de cintura pèlvica.		2		Després de les operacions
	Animal quiet durant llarga estona + arqueig + plegament cintura pèlvica + agonia		3		

**Taula 1.** Sistema numèric per a la valoració de cada paràmetre per determinar l'estat de l'animal.

### 3.2.2 Trasplantament del tumor

El trasplantament del tumor va consistir en fragmentar en seccions de 5x5 mm el *xenograf* de tumor de pròstata procedent d'un animal sacrificat i implantar-lo subcutàniament a la regió dorsal cervical d'un nou ratolí nu (*swiss nude*). Per a fer-ho, es va fer una petita incisió a la pell en la part dorsal cervical de l'animal i es col·locà el fragment tumoral sota el teixit adipós que hi ha en aquesta zona cervical, ja que és on hi ha major irrigació. Per col·locar-lo correctament, calgué estirar aquest teixit adipós amb unes pinces i amb unes altres de més fines esquinçar-lo per deixar oberta una petita cavitat que fou ocupada pel tumor. Un cop col·locat el tumor, es procedí a suturar la incisió de l'animal amb fil de sutura de polipropilè de 6/0 (Surgilene) i s'aplicà povidona iodada a la ferida, i finalment, l'analgèsic. A continuació es mostren unes fotografies del procés de trasplantament (figura 20).



**Figura 20.** Imatges seqüencials del procés de trasplantament del *xenograf*. **A)** Manteniment de l'animal amb l'anestèsia. **B)** Aplicació del Methocel als ulls del ratolí. **C)** Comprovació dels reflexes de l'animal per saber si està completament adormit. **D i E)** Realització de la incisió a la zona cervical i comprovació de la mida de l'obertura. **F)** Localització del teixit adipós cervical per a extreure'l i esquinçar-lo, per a facilitar la implantació del fragment del tumor. **G)** Implantació del tumor sota el teixit adipós. **H i I)** Inici i final de la sutura, respectivament.

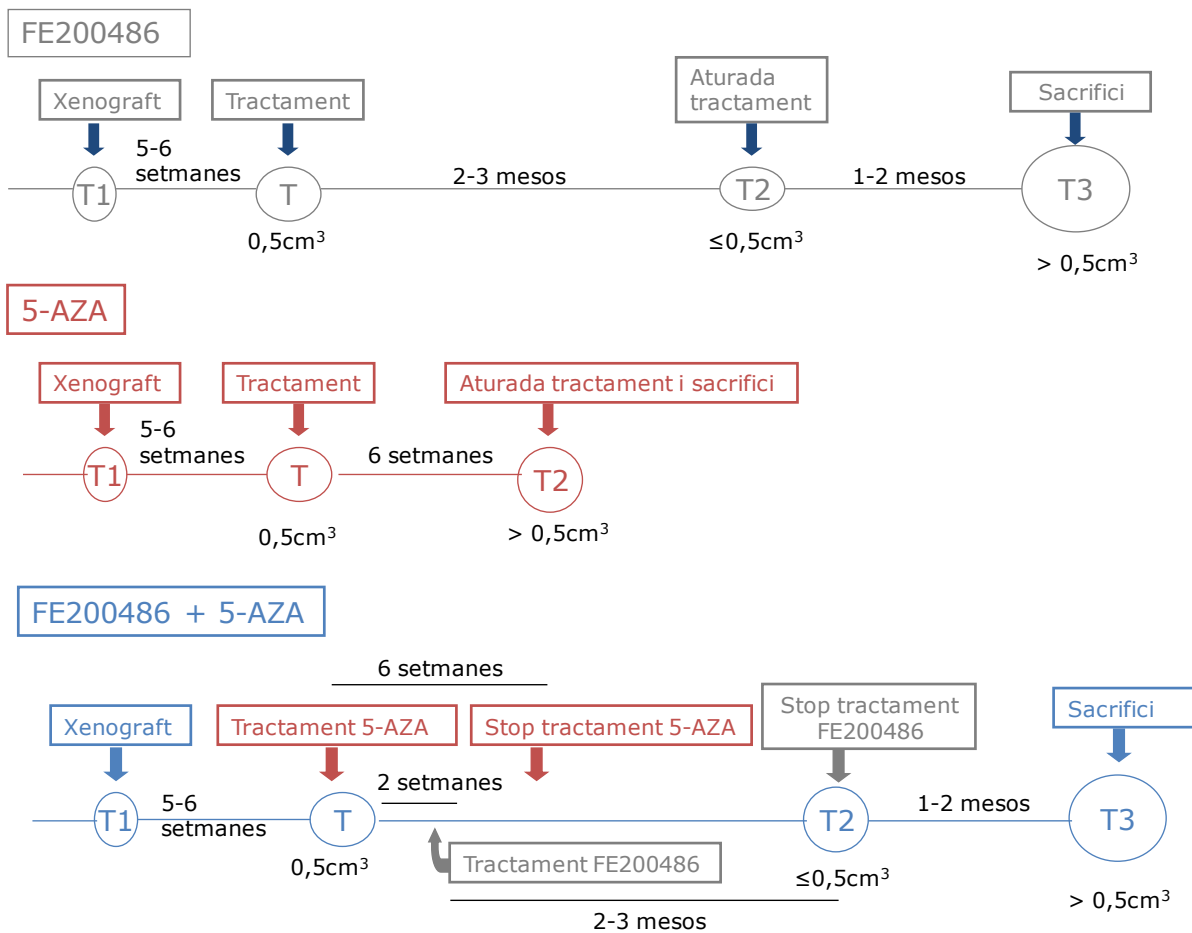
### 3.2.3 Tractaments

#### 3.2.3.1 Castració química

Per a realitzar la castració química dels animals es va utilitzar un antagonista de l'hormona alliberadora de gonadotropina, el FE200486 (cedit per la Dra Poupon), segons la descripció de *de Pinieux et al.*, 2001 (de Pinieux, Legrier et al. 2001). El FE200486 s'administrà als animals amb injecció subcutània a un dels flancs laterals dels ratolins nusos, una dosi cada 2 setmanes de 2mg/kg, solubilitzat en 5% de D- manitol (Sigma), utilitzant 0.1 ml com a volum màxim injectable.

Els animals tractats amb FE200486 es van dividir en dos grups: a) animals tractats de manera constant amb FE200486 (n=6), sense interrompre el tractament, i b) els animals tractats amb FE200486 de manera intermitent (n=6). En el primer grup es van tractar els animals quan el volum del tumor era  $\leq 0'5 \text{ cm}^3$ ; aquest es mesurava un cop per setmana per detectar variacions. D'aquest grup s'obtingueren biòpsies/mostres de dos temps: una just abans de la implantació (T1) i la segona (T2) al moment del sacrifici, quan la supressió hormonal era màxima. En aquest grup també hi havia animals on el tumor que se'ls hi havia trasplantat provenia d'animals castrats químicament amb el FE200486 que, per edat, es van haver de sacrificar. Així doncs, aquests nous hostes es van tractar amb FE200486 abans de la implantació del tumor ja que el tumor que se'ls hi trasplantava estava deprivat d'hormona. En aquest cas no ens calia tenir una biòpsia a T1 (moment de la implantació).

Al segon grup, els animals es van tractar de manera intermitent, obtenint també una biòpsia de T1 (a l'implantar el tumor), una mostra a temps de supressió màxima (T2; es va considerar aquest temps després de com a mínim 90 dies sense canvi en el volum del tumor) a partir del qual s'alliberà als animals de la supressió, i una mostra a T3 (al moment del sacrifici de l'animal), passats també 90 dies des de l'alliberament de l'animal de la supressió. A un subgrup del tractament intermitent (n=3), enlloc de sacrificar als animals en el T3, se'ls hi feia una biòpsia del tumor en T3 seguint els criteris d'anestèsia i analgèsia ja descrits anteriorment, i es deixava als ratolins amb vida. Es recollia mostra al sacrifici (T3b) al cap de 40 dies per determinar si es mantenia el mateix patró que en el T3. La figura 21 recull un esquema dels tractaments.

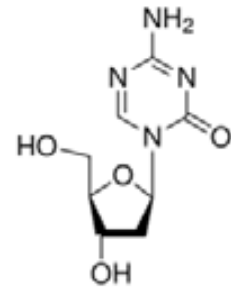


**Figura 21.** Tractaments (T) realitzats als ratolins PAC120. T1: mostra en el moment de la implantació. T2: biòpsia en el temps màxim de tractament. T3: mostra després de l'alliberament del tractament.

Per comprovar que les biòpsies no alteraven el comportament habitual del tumor, es van biopsiar animals amb tumor implantat però sense tractament. Per a realitzar les biòpsies es va anestesiàr l'animal, es va fer una incisió en la zona cervico-dorsal, es va biopsiar el tumor i es va suturar la incisió. A l'animal se li va aplicar analgèsia al final del procés, després de l'aplicació de la povidona iodada. Igualment també es va fer un grup d'animals injectats subcutàniament amb D-manitol (n=3), dissolvent del FE200486.

### 3.2.3.2 Tractament amb 5-aza-2'-deoxicitidina (5-AZA)

La 5-AZA (figura 22) és un compost químic que inhibeix l'activitat de les DNA metiltransferases la qual cosa facilita la desmetilació del DNA i l'activació de gens deguda a la remodelació de la cromatina. Si aquesta desmetilació es combina amb la hiperacetil·lació es produeix una reactivació sinèrgica dels gens.



**Figura 22.** Estructura química de la 5-aza-2'-deoxicitidina.

Un cop el tumor ja estava implantat i el seu volum era  $\leq 0,5 \text{ cm}^3$ , un grup d'animals (n=4) es va tractar amb la 5-AZA, a la concentració de 2,5 mg/mL, mitjançant injecció intraperitoneal (i.p.) durant 6 setmanes, 3 dies consecutius cada setmana; cada dia s'alternava el costat de la injecció. Igual que en el grup anterior, es va recollir un T1 (abans de la implantació) i un T2 (al sacrifici, al moment final del tractament amb 5-AZA). Com que el vehicle de la 5-AZA era el tampó PBS, no es tractà cap animal amb aquest diluent.

Adicionalment, un grup de ratolins van ser tractats conjuntament amb 5-AZA i FE200486 quan els tumors van arribar al volum  $\leq 0,5 \text{ cm}^3$ . A aquests se'ls hi va injectar la primera dosi de 5-AZA i no va ser fins a la segona setmana de tractament que no es va procedir a injectar el FE200486 subcutàniament als animals. Així doncs un total de 4 ratolins es van tractar amb 5-AZA durant les 6 setmanes mentre que el tractament amb FE200486 es va continuar fins als 90 dies (des de la primera injecció de FE200486), quan es va recollir la mostra del T2. Es van alliberar els animals del tractament i al cap de 60 dies es van sacrificar, recollint la mostra al moment T3.

### 3.2.3.3 Inducció de la diabetis amb estreptozotocina (STZ)

Es van generar dos grups d'animals diabètics; un primer grup tractat amb la STZ abans de la implantació del tumor (n=6), i un segon grup tractat amb la STZ després de la implantació del tumor (n=6). A més a més vam disposar d'un grup control (n=3). Els animals tractats abans de la implantació es van fer diabètics injectant intraperitonealment 6 mg de STZ una setmana abans de l'operació de trasplantament tumoral. Durant aquesta setmana es va mesurar la glicèmia dels animals amb el glucòmetre *Optium Xceed™* (Abbott Diabetes Care,

MediSense) obtenint la mostra de sang de la vena de la cua. Un cop passat aquest temps, es va implantar el tumor tal i com s'ha explicat en l'apartat 3.2.2. Als animals del grup tractat amb STZ després de la implantació, se'ls hi va implantar el tumor, i quan el volum d'aquest era  $\leq 0'5 \text{ cm}^3$  es va procedir a subministrar la STZ igual que en el grup anterior. Al grup d'animals control se'ls hi va injectar també intraperitonealment tampó citrat 50 mM a pH 4,5 ja que era el diluent de la STZ. A tots tres grups es va mesurar la glicèmia un o dos cops per setmana i se'ls hi va mantenir el tractament durant deu setmanes (sempre considerant com a temps 0 el moment d'inici de tractament amb STZ). Un altre dels tractaments administrats als animals amb la diabetis induïda per la STZ era el tractament amb QNZ, un inhibidor del NF- $\kappa$ B. Per a realitzar aquest tractament es van dividir els animals en tres grups: un grup d'animals control (n=3), un grup d'animals amb la diabetis induïda per STZ (n=5) i un grup d'animals amb la diabetis induïda per STZ tractats i no tractats amb QNZ (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en l'aigua dels animals)(n=5). A aquests animals se'ls hi va implantar el tumor i quan el volum d'aquest va ser  $\leq 0'5 \text{ cm}^3$  se'ls va separar en controls o tractats. Als tractats se'ls hi va induir la diabetis, i un cop assegurada la hiperglicèmia es van separar en un grup d'animals només diabètics i un grup d'animals diabètics tractats amb QNZ. Al grup control se li va dissoldre en aigua el DMSO, el diluent del QNZ. A tots tres grups d'animals se'ls hi va controlar el pes, el volum tumoral i la glicèmia un cop per setmana.

### **3.3 PURIFICACIÓ D'ÀCIDS NUCLEICS**

#### **3.3.1 Extracció de RNA total.**

##### **3.3.1.1 Extracció de RNA de línies cel·lulars**

L'extracció de RNA en les línies cel·lulars es va fer utilitzant el kit comercial *RNeasy Mini Kit 50* (Qiagen, Hilden, Germany) basat en columnes cromatogràfiques d'afinitat per evitar la manipulació de substàncies potencialment tòxiques com el fenol i el cloroform que sí s'utilitzen en el mètode clàssic (Chomczynski and Sacchi 1987). El procediment per fer-ho va ser el següent:

1. Es van afegir 350  $\mu$ L del tampó RLT del kit prèviament mencionat més  $\beta$ -mercaptoetanol (10  $\mu$ L/mL *buffer* RLT) al *pellet* de cèl·lules obtingut en la tripsinització i es resuspèn.
2. Es va homogeneïtzar la solució fent-la passar per una agulla de 27G entre 8 i 10 cops.
3. Es va afegir un volum d'etanol al 70% i s'aplicà la barreja a la columna proveïda pel kit.
4. Es van fer els diferents rentats, el tractament amb DNAsa i l'elució del RNA per centrifugació seguint les instruccions del fabricant.

La quantificació del RNA es realitzà amb l'espectrofotòmetre Nano-Drop ND-100 Spectrophotometer (Nanodrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) i la seva integritat es comprovà mitjançant gels d'agarosa al 2%.

### **3.3.1.2 Extracció de RNA de teixits**

Aquesta extracció consta de diferents fases. La primera fase (fase d'homogeneïtzació) es va fer en una campana d'extracció de gasos. Les mostres es van mantenir en gel o neu carbònica i se'ls hi va afegir 1mL de TRIzol (Qiagen). Un cop afegit, es van vortejar durant 30 segons i es van tornar a mantenir en gel. Es van barrejat les mostres amb una xeringa uns deu cops amb una agulla de 27G per a homogeneïtzar bé la mostra. Seguidament es va centrifugar la mostra a 12000g, 10 minuts a 4°C per eliminar proteïnes, polisacàrids, etc.; es va recollir el sobrenedant i es guardà en un tub i en gel. A partir d'aquest moment es va iniciar la separació per fases, afegint 200  $\mu$ L de cloroform per cada mil·lilitre de TRIzol, i agitant manualment amb energia durant 15 segons. Es va centrifugar a 12000g durant 15 minuts a 4°C; a partir d'aquest moment ja es podia dur a terme tota la manipulació fora de la campana. Un cop finalitzada la centrifugació vam poder observar tres fases:

- Fase inferior: color del TRIzol, i conté el fenol-cloroform.
- Interfase: banda de color blanc, on es troba el DNA i les proteïnes.
- Sobrenedant o fase aquosa: transparent, i conté el RNA total.



Per a precipitar el RNA i netejar-lo, es pipetejà la fase aquosa i es calculà el volum que se n'havia obtingut, ja que es transferia a un tub nou i se li afegia el mateix volum d'etanol al 70%. Després d'aquest procés es van seguir els mateixos passos que per a l'extracció de RNA de cèl·lules (apartat 3.3.1.1) explicats al protocol del kit de Qiagen; es va passar la fase aquosa més l'etanol per la columna, es van fer els rentats amb els tampons del kit, la digestió amb DNAsa i finalment es va eluir el RNA. La quantificació i la comprovació de la integritat d'aquest es va fer tal i com s'ha explicat en l'apartat 3.1.1

### **3.3.2 Purificació de DNA plasmídic.**

#### **3.3.2.1 Purificació a petita escala de DNA plasmídic (*Miniprep*)**

L'extracció i purificació del DNA plasmídic es va dur a terme amb el kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen). El procés es basa en el tractament del lisat bacterià amb una proteasa alcalina aïllada del bacteri *Bacillus licheniformis*, que actua inactivant específicament les endonucleases i inespecíficament degradant proteïnes reduint així qualsevol possible contaminació. El DNA plasmídic es va extreure seguint els següents passos:

- Recollida i ressuspensió de les cèl·lules bacterianes.
- Lisi alcalina
- Neutralització i precipitació proteica i del DNA genòmic.
- Unió del DNA plasmídic a la resina de la columna.
- Rentats de la columna per centrifugació i elució.

#### **3.3.2.2 Purificació a gran escala del DNA plasmídic (*Maxiprep*)**

Aquestes grans quantitats de DNA plasmídic es van requerir per a realitzar les transfeccions de les construccions d'AR. En aquests casos es va purificar el DNA recombinant a partir de cultius d'*E. Coli* de més volum i es va seguir el protocol detallat del kit *PureLink® HiPure Plasmid Filter Maxiprep* d'Invitrogen.

### **3.3.3 Purificació d'àcids nucleics a partir de gels d'agarosa.**

Per a visualitzar els diferents resultats obtinguts amb RNA i DNA (productes de les PCRs, digestions enzimàtiques, amplificació del DNA bisulfitat, etc.) es va utilitzar l'electroforesi en gels d'agarosa (Ecogen, Barcelona, Catalunya), que permet separar l'àcid nucleic en funció de la seva mida. Els percentatges d'agarosa van variar entre el 0'8 i el 2% i aquesta es va dissoldre en tampó TAE 1x (0'4mM Tris, 10mM EDTA pH 8.0) i es va utilitzar *SYBR® Safe DNA gel stain* (Invitrogen) per visualitzar l'àcid nucleic amb llum ultraviolada. A l'electroforesi se li aplicà una diferència de potencial entre 70 i 150V.

A les mostres se'ls hi va afegir tampó de càrrega (60% glicerol, 0,15% Orange G, i 60 mM EDTA) abans de carregar-les en els pous del gel; en un d'aquests pous es va carregar un marcador de pesos (100bp o 1 Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) per identificar la mida de les nostres bandes d'interès.

El fragment desitjat es va extreure de la matriu d'agarosa mitjançant una ganiveta i es va purificar amb el *Qiaquick Gel Extration kit* (Qiagen) segons les instruccions del proveïdor.

### **3.3.4 Purificació dels productes de PCR semiquantitativa.**

Els productes de les RT-PCRs es van purificar separant les restes de sals, encebadors i enzims amb el *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen). Aquest kit es basa en el procés unió – rentat – elució gràcies a una membrana de sílica que facilita la unió del DNA amb un tampó amb moltes sals per a eluir-lo després amb aigua i net de qualsevol residu procedent de la PCR. Amb aquest sistema es poden purificar fragments de DNA entre 0,1 i 10 kb seguint les instruccions indicades pel fabricant.

## **3.4 ANÀLISI D'ÀCIDS NUCLEICS**

### **3.4.1 Amplificació d'àcids nucleics**

L'amplificació d'àcids nucleics permet obtenir una quantitat important de DNA a partir d'un àcid nucleic motlle alhora que fa possible la introducció de modificacions específiques (introducció d'una diana de restricció, mutagènesi dirigida, etc.). Les condicions

d'amplificació varien depenent de diversos factors com són el fragment a amplificar, l'enzim que utilitzem i els encebadors.

### 3.4.2 Retrotranscripció (RT)

La retrotranscripció inversa permet obtenir un cDNA de doble cadena a partir del RNA total o del mRNA corresponent. En funció de l'experiment, entre 2 i 4 µg de RNA extret o bé de línies cel·lulars o bé de teixits es va retrotranscriure en un volum total de 20 µL, utilitzant 200 U de la transcriptasa inversa *SuperScript II Reverse transcriptase* (Invitrogen-Life technologies) en cada reacció. Per a la reacció també es van utilitzar oligodT a una concentració de 100mM, 1mM de ditiotreitòl (DTT), tampó de la polimerasa 5X (25mM Tris-HCl, 75mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>) i 10 mM de la barreja de dNTPs i es van seguir els següents passos:

1. Barrejar la quantitat de RNA desitjada amb aigua fins a tenir un volum de 11µL.
2. Afegir a la barreja 1 µL d'oligodT a 100mM
3. Deixar 5 minuts a 65°C en el termociclador.
4. Passat aquest temps, mantenir en gel i afegir els dNTPs (10mM), el tampó 5X, el DTT.
5. Posar 10 minuts a 25°C i 1 minut a 42°C
6. Afegir la transcriptasa i deixar 50 minuts a 42°C, 15 minuts a 72°C i a 4°C a temps indefinit.

El termociclador utilitzat ha estat PTC-100 (MJ Research, Inc., Waltham, MA, USA).

### 3.4.3 Disseny dels encebadors.

Les seqüències dels gens a analitzar es van obtenir de la base de dades del *National Center of Biotechnology Information (NCBI)* i els encebadors es van dissenyar amb i sense l'ajut de programes com *Primer Express Software v2.0* (<http://www.appliedbiosystems.com>) o *Oligonucleotide Properties Calculator* (<http://www.unc.edu/~cail/biotool/oligo/>) per al disseny i la posterior comprovació de la no formació d'estructures secundàries i de la temperatura d'anellament adient.

La síntesi dels encebadors es va encarregar a la casa Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA) i a Invitrogen. Els encebadors utilitzats i les seves característiques es troben recollits a la taula 2.

#### 3.4.4 PCR

Les reaccions en cadena de la polimerasa (PCR) semi quantitatives es van fer amb la polimerasa EcoTaq i els seus reactius (Ecogen, Barcelona, Espanya) a un volum final de 20 µL. Cada reacció contenia: 2µL de tampó de reacció 10x (160mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM Tris-HCl pH 8.8 a 25°C, 0'1% Tween 20), 2 µL de dNTPs 2mM, 2'4 µL MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0'5 µL de cada encebador a 10µM, 1 µL de cDNA, 0'2 µL d'EcoTaq polimerasa 5U/µL i la resta de volum d'aigua.

Les PCRs es van realitzar en un termociclador Minicycler (MJ Research, Inc.) i les condicions d'amplificació van variar en funció del gen i la mida del fragment a amplificar, però seguien el següent patró:

94°C 5 minuts	
94°C 30 segons	} 28 a 40 cicles
55-60°C 30segons	
72°C 20seg-1minut	
72°C 7 minuts	
4°C ∞	

El gen ribosomal S18 es va utilitzar com a control de la integritat del RNA i com a normalitzador de l'expressió gènica; s'amplificava 28 cicles en la reacció de PCR i a la mateixa temperatura d'anellament que el gen problema.

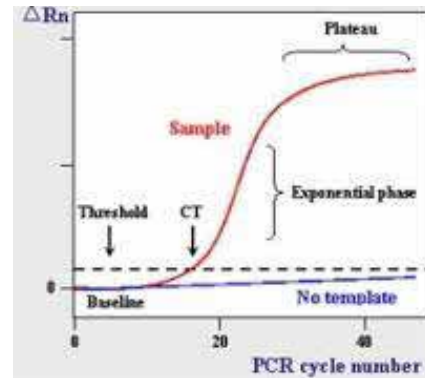
Nom i sentit	Gen	Seqüència (5'-3')
<b>h18S (S)</b>	S18	TAACGAACGAGACTCTGGCAT
<b>h18s (AS)</b>	S18	CGGACATCTAAGGGCATCACAG
<b>AR1aup3 (S)</b>	AR	GCATGGTGAGCAGAGTGCCCTATC
<b>AR1b (S)</b>	AR	ATGATACTCTGGCTTCACAG
<b>AR1D (S)</b>	AR	TATTCCTCACCGCAGTTGTTGA
<b>AR1Eup1 (S)</b>	AR	TTCTCAGCGGGTATCCTCCAG
<b>AR1Eup2 (S)</b>	AR	AAGACCGGCCAATAGCTTC
<b>AR1Cup1 (S)</b>	AR	AACATTCTGAAATGGCCTACC
<b>AREx2-3up (S)</b>	AR	AAGAGCCGCTGAAGGGAAAC
<b>AREx3up (S)</b>	AR	TTGCACTATTGATAAATTCCG
<b>AREx7up (S)</b>	AR	TCCCACATCCTGCTCAAGACG
<b>AR2L (AS)</b>	AR	TCCATAGTGACACCCAGAAG
<b>AR2L2 (AS)</b>	AR	ATCAGGCAGGTCTTCTGGG
<b>AR3L (AS)</b>	AR	ATCCCTGCTTCATAACATTTCCG
<b>AR3L3 AS)</b>	AR	CGAAGACGACAAGATGGACA
<b>AR4L (AS)</b>	AR	AAGGAGTCGGGCTGTTGT
<b>AR5L (AS)</b>	AR	ATCAGGGGCGAAGTAGAGCATC
<b>AR7L (AS)</b>	AR	AGCGTCTTGAGCAGGATGTGG
<b>AR8L (AS)</b>	AR	TGGGTGTGGAAATAGATG
<b>hPSA (F)</b>	PSA	GCACCCGGAGAGCTGTGT
<b>hPSA (R)</b>	PSA	GATCACGCTTTT GTTCTGAT

**Taula 2.** Relació d'encebadors utilitzats i les respectives seqüències en sentit 5' → 3'. S: encebador sentit. AS: encebador antisentit.

### 3.4.5 PCR quantitativa a temps real (qPCR)

La tècnica de la PCR a temps real consisteix en la detecció i anàlisi de la quantitat de producte generat a cada cicle d'amplificació. Aquesta quantitat de producte està directament relacionada amb la quantitat de cadenes de cDNA prèvies a l'inici del procés de PCR. La detecció del producte generat cicle a cicle és possible gràcies a la capacitat dels nous termocicladors de PCR per detectar emissions de fluorescència. Aquest procés d'amplificació consta de tres fases (figura 23):

- a) Fase geomètrica o exponencial: existeix una alta precisió entre la concentració de DNA i el cicle de la PCR.
- b) Fase lineal: no hi ha correlació entre l'amplificació de DNA i el cicle de la PCR.
- c) Fase *plateau*: saturació dels reactius i amplificació mínima.



**Figura 23.** Esquema de la corba d'amplificació.

<https://www.udg.edu/>

El marcador fluorescent SYBRGreen (Invitrogen SA) s'uneix al solc menor de la doble cadena de DNA. Quan es troba unit, la capacitat d'emissió de fluorescència augmenta. Per tant, major quantitat de DNA amplificada es correlaciona amb major emissió de fluorescència.

La màxima eficiència de la reacció la trobem en la fase geomètrica, per això és en aquest punt on es pot comparar si un gen s'expressa més o menys que un altre. Per comprovar que l'amplificació és proporcional a la quantitat de DNA inicial es realitza un banc de dilucions des de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fins a 1/10000. Les corbes d'amplificació indiquen l'augment progressiu de fluorescència resultant dels diferents cicles de la PCR. S'estableix un llindar de detecció o *threshold* en el punt en què la corba permet una detecció de fluorescència superior al *background* o soroll de fons dins de la fase exponencial. El cicle en què l'amplificació del gen assoleix aquest nivell s'anomena Ct (*cycle threshold*). Amb els diferents Ct en relació a la quantitat de DNA s'obté una recta el pendent de la qual permet determinar l'eficiència de la reacció. Un pendent de -3,32 indica que l'eficiència de la PCR és d'un 100%, podent-se determinar així amb exactitud els Ct de les mostres problema i, per tant, la seva quantitat.

Les condicions de reacció han estat:

50°C	2 minuts	
95°C	10 minuts	40 cicles
95°C	15 segons	
58 -60°C	1 minut	
95°C	15 segons	
58-60°C	20 segons	Corba dissociació
95°C	15 segons	
95°C	15 segons	

### 3.4.5.1 Anàlisi de les dades obtingudes mitjançant qPCR

Cal esmentar que per a aplicar el mètode comparatiu de Ct's ( $2^{-\Delta Ct}$ ) en l'anàlisi de les dades s'han de realitzar 3 passos:

- Primer es fa la mitjana dels 3 valors de Ct obtinguts dels triplicats de cada condició, i llavors es resten la mitjana dels Ct del gen problema de la mitjana dels Ct del gen control.
- Després es calcula la  $\Delta\Delta Ct$ , és a dir,  $\Delta Ct$  mostra problema -  $\Delta Ct$  mostra control
- Finalment es calcula el  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . El valor resultant ens indica quina és l'expressió relativa del gen en concret en aquestes mostres i en les condicions que s'ha realitzat l'experiment.

Els encebadors per a la qPCR han estat dissenyats manualment o s'ha consultat a la base de primers qPrimerDepot (<http://primerdepot.nci.nih.gov/>), i es troben recollits a la taula 2.

### 3.5 ANÀLISI DELS EXTREMS 5' I 3' D'AR

#### 3.5.1 5' RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends (5' RLM-RACE)

El RLM-RACE és una tècnica basada en la reacció en cadena de la polimerasa a partir de la qual s'amplifica cDNA únicament a partir de mRNA amb cap (7-metilguanosa).

L'esquema següent (figura 24) mostra els passos a seguir per obtenir el cDNA *full length*. Es va tractar el RNA amb l'enzim CIP (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*) per eliminar els fosfats lliures en l'extrem 5' de molècules com rRNA, mRNA fragmentat, etc., deixant les estructures cap intactes. Després es tractà el

RNA amb TAP (Tobacco Acid Pyrophosphate) per eliminar l'estructura cap i deixar un monofosfat a 5'. S'afegí l'encebador *adapter* o adaptador mitjançant T4

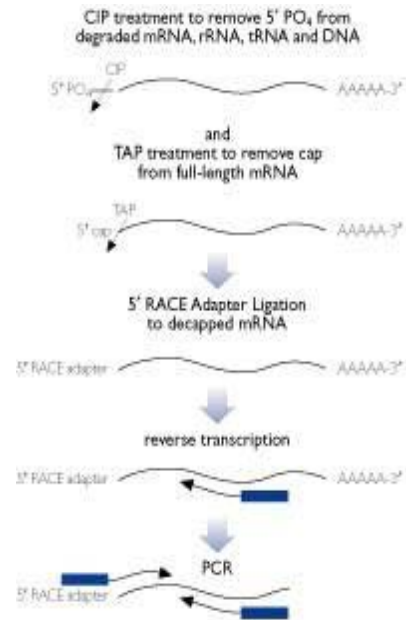
RNA lligasa, que lligà específicament l'adaptador amb el mRNA monofosfat, i es continuà el procés amb la retrotranscripció utilitzant *random-primers*. Finalment es va fer l'amplificació per *nested PCR* utilitzant encebadors sentit que s'uneixen a la zona de l'adaptador i encebadors antisentit específics del gen que estem estudiant.

Es va fer la tècnica del 5' RLM – RACE amb els RNAs obtinguts de les línies cel·lulars DU145, PC3 i LNCaP, i també amb testicle fetal i placenta.

El procediment a seguir va ser el següent:

-Processament del RNA.

1) Tractament amb Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIP)



**Figura 24.** Esquema dels passos del 5'RLM-RACE (Ambion).



Quantitat	Component	Temps de tractament
x $\mu\text{L}$	RNA total (10 $\mu\text{g}$ )	
2 $\mu\text{L}$	10X tampó CIP	1 hora a 37°C
2 $\mu\text{L}$	CIP	
fins 20 $\mu\text{L}$	Aigua lliure de nucleasa	

2) Acabament de la reacció amb CIP i extracció amb àcid fenol:cloroform

Quantitat	Component
15 $\mu\text{L}$	Solució acetat d'amoni
115 $\mu\text{L}$	Aigua lliure de nucleasa
150 $\mu\text{L}$	Àcid fenol:cloroform

Es va vortejar, centrifugar durant 5 minuts a TA a  $> 10.000\text{g}$ . Es va transferir la fase aquosa a un nou tub.

Es va afegir 150  $\mu\text{L}$  de cloroform, es va vortejar, es va centrifugar durant 5 minuts a TA a  $> 10.000\text{g}$ . Es transferí la fase aquosa a un tub nou.

Se li va afegir 150  $\mu\text{L}$  d'isopropanol, es va vortejar i es va mantenir en gel 10 minuts.

Es va centrifugar a màxima velocitat durant 20 minuts, es rentà el *pellet* obtingut amb etanol fred al 70%. Es va centrifugar 5 minuts a velocitat màxima, es va treure l'etanol i es va deixar assecar el *pellet*.

Un cop sec, es va resuspendre el *pellet* amb 11  $\mu\text{L}$  d'aigua lliure de nucleases (reservar 1  $\mu\text{L}$  del RNA tractat amb CIP per a "TAP-menys").

### 3) Tractament amb Tobacco Acid Pyrophosphatase (TAP)

Quantitat	Component	Temps de tractament
5 µL	RNA tractat amb CIP	
1 µL	10X tampó TAP	1 hora a 37°C
2 µL	TAP	
2 µL	Aigua lliure de nucleasa	

### 4) Lligació

Quantitat	Component	Temps de tractament
2 µL	RNA CIP/TAP tractat	
1 µL	Adaptador 5'RACE	1 hora a 37°C
1 µL	10x tampó RNA lligasa	
2 µL	T4 RNA lligasa	
4 µL	Aigua lliure de nucleasa	

### 5) Transcripció reversa (RT)

Quantitat	Component	Temps de tractament
2 µL	RNA lligat (o TAP menys)	
4 µL	Mix dNTPs	1 hora a 42°C
2 µL	<i>Random</i> decàmers	
2 µL	10x Tampó RT	
1 µL	Inhibidor RNasa	
1 µL	M-MLV transcriptasa reversa	
Fins 20 µL	Aigua lliure de nucleasa	

6) *Nested* PCR

Es procedeix a fer la reacció “Outer 5’ RLM-RACE PCR”

Quantitat	Component
1 µL	Reacció RT
5 µL	10x Tampó PCR
4 µL	Mix dNTPs
2 µL	5’RACE encebador específic gen
2 µL	5’RACE <i>outer primer</i>
1.25 U	DNA polimerasa termostable
Fins 50 µL	Aigua lliure de nucleasa

94°C	3 minuts	
94°C	30 segons	} 35 cicles
60°C	30 segons	
72°C	2 minuts	
72°C	7 minuts	

Es procedeix a fer la reacció “ Inner 5’ RLM-RACE PCR”

Quantitat	Component
1-2 µL	Producte “outer PCR”
5 µL	10x Tampó PCR
4 µL	Mix dNTPs
2 µL	5’RACE encebador específic gen
2 µL	5’RACE <i>inner primer</i>
1.25 U	DNA polimerasa termostable
Fins 50 µL	Aigua lliure de nucleasa

94°C	3 minuts	
94°C	30 segons	} 35 cicles
60°C	30 segons	
72°C	2 minuts	
72°C	7 minuts	

Els productes de les PCRs es van córrer en un gel d'agarosa a l'1,5%, es va retallar, clonar i seqüenciar.

### 3.5.2 3' Rapid Amplification of cDNA Ends (3'RACE)

El 3'RACE és una tècnica que s'utilitza per amplificar i clonar seqüències de l'extrem 3' del RNA missatger que ens interessa estudiar.

El procés consisteix en sintetitzar cDNA a partir del RNA total o poliA-RNA amb l'adaptador a l'extrem 3' (3'RACE *adapter*). El cDNA obtingut s'utilitza com a motlle de la PCR i s'utilitza un encebador sentit específic del gen que estem estudiant i un encebador antisentit, que és complementari a la seqüència de l'adaptador; el 3' RACE no requereix de *nested PCR*.

Les línies cel·lulars LNCaP i DU145 van ser utilitzades per realitzar el 3'RACE, seguint els passos indicats en el kit. El primer pas era la transcripció inversa, feta en les següents condicions:

Quantitat	Component
2 µL	RNA (1 µg)
4 µL	Mix Dntp
2 µL	Adaptador 3' RACE
2 µL	10X tampó RT
1 µL	Inhibidor RNAsa
1 µL	M-MLV transcriptasa inversa
8 µL	Aigua lliure de nucleasa

Un cop finalitzada la transcripció inversa, es va procedir a realitzar la PCR (segon pas):

Quantitat	Component
1 $\mu\text{L}$	Reacció de Retrotranscripció
5 $\mu\text{L}$	10x tampó PCR
4 $\mu\text{L}$	Mix dNTP
2 $\mu\text{L}$	3' RACE encebador específic gen (10 $\mu\text{M}$ )
2 $\mu\text{L}$	3'RACE <i>Outer primer</i>
Fins 50 $\mu\text{L}$	Aigua lliure de nucleasa
1.25 U	DNA polimerasa termostable

Condicions:

94°C	3 minuts	
94°C	30 segons	} 35 cicles
60°C	30 segons	
72°C	30 segons	
72°C	7 minuts	

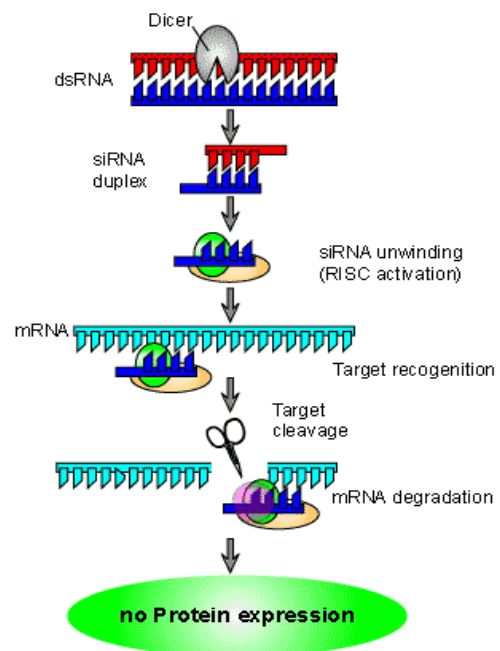
Un cop finalitzada la PCR, es va procedir a córrer el producte en un gel d'agarosa, es retallà la banda i es procedí a fer el clonatge amb el kit TOPO TA Cloning (Invitrogen).

Els encebadors utilitzats en el 5' RACE són AR5L, AR3L, AR2L, i en el 3' RACE són Ex7up i Ex3up. Les seves seqüències estan recollides a la taula d'encebadors (Taula 2).

### 3.6 MECANISMES DE SILENCIAMENT GÈNIC: EL siRNA

#### 3.6.1 Principis generals

El RNA d'interferència (RNAi) és un mecanisme de silenciament gènic conservat evolutivament i present en nombroses varietats d'espècies eucariotes. RNAi utilitza seqüències curtes de doble cadena de RNA (dsRNA) que vehiculen la degradació o la repressió de la transcripció d'una seqüència homòloga de RNA diana, d'una forma específica per a la seqüència utilitzada. Aquest sistema pot ser induït eficientment *in vitro* i *in vivo* mitjançant l'aplicació directa de siRNAs o per l'expressió mitjançant vectors virals o no virals de shRNAs. La tècnica s'ha convertit en una eina molt útil per als estudis genòmics funcionals i presenta un gran potencial en terapèutica (Ma, Chan et al. 2007).



**Figura 25.** Mecanisme d'acció del siRNA. <http://www.scq.ubc.ca/antisense-rna/>

Els siRNAs són dúplex preformats de RNA de 21 bp que, un cop introduïts a la cèl·lula són reconeguts i formen una estructura triplex amb el RNA diana. Aquesta estructura és reconeguda per la maquinària de degradació d'aquest RNA, el complex RISC (*RNA induced silencing complex*)(figura 25).

#### 3.6.2 Protocol

El siRNA utilitzat es va adquirir a GeneGlobe (núm. de catàleg: SI02757265), i la seqüència diana és AAGGAACTCGATCGTATCATT. Es van sembrar  $3 \times 10^5$  cèl·lules per pou en plaques de 6 pous el dia previ a la transfecció amb la barreja del siRNA; l'endemà es procedí a fer la transfecció segons les indicacions del proveïdor i es va deixar durant 48 hores. Transcorregut aquest temps, de cada pou es va recollir material per extreure RNA i proteïna que es va processar tal i com s'ha explicat en els apartats 3.3.1.1 i 3.13.1, respectivament.

El siRNA control utilitzat es va adquirir a Qiagen (núm. de catàleg: 1022076), i es va procedir exactament igual que amb el siRNA d'interès.

### 3.7 MUTAGÈNESI DIRIGIDA

La mutagènesi dirigida amb el kit *GENEART®Site-Directed Mutagenesis System* (Invitrogen) és un mètode simple i molt eficient per substituir bases, incloure deleccions o insercions en el DNA *in vitro*. En el nostre cas, es va substituir una base (A → G).

El plàsmid de DNA amb la seqüència a mutar era Flag + AREx3up-8L. Per a fer-ho, es van seguir els passos detallats en el manual del fabricant.

A mode de resum dir que consistien en:

- Una primera fase de metilació i mutagènesi, on la PCR es va realitzar seguint els paràmetres que es recullen en la taula següent:

Temperatura	Temps	Núm. De cicles
37°C	15 minuts	1
94°C	2 minuts	
94°C	20 segons	15 cicles
57°C	30 segons	
68°C	4 minuts	
68°C	5 minuts	1
4°C	Infinít	1

- Una segona fase de recombinació, on es va seguir estrictament el protocol establert en el kit.
- La fase de transformació en DH5α™-T1® *E.Coli*, on s'inocularen 2 µL de la reacció de recombinació en els cèl·lules competents, es deixà la barreja 12 minuts en gel i es prosseguí amb un xoc tèrmic. Es van recuperar les cèl·lules amb medi SOC durant 1 hora a 37°C i a 225 rpm i finalment es van sembrar en una placa de LB amb l'antibiòtic necessari; es deixaren 16 hores a 37°C.

- Finalment, es va procedir a escollir les colònies i a analitzar la seqüenciació per veure si s'havia incorporat la mutació.

#### ENCEBADORS UTILITZATS EN LA MUTAGÈNESI DIRIGIDA

<b>ARMutCons S</b>	5' GACGACAAGCTCAAGCTTGGG <b>G</b> TGACTCTGGGAGCCCGGAAGC 3'
<b>ARMutCons AS</b>	5' GCTTCCGGGCTCCCAGAGTCA <b>C</b> CCAAGCTTGAGCTTGTCGTC 3'

**Taula 3.** Encebadors utilitzats en la mutagènesi dirigida, en sentit 5' → 3'. En vermell es marca el nucleòtid mutat. S: encebador sentit. AS: encebador antisentit.

### 3.8 ANÀLISI DE LA METILACIÓ DEL DNA

#### 3.8.1 Extracció de DNA

El DNA genòmic es va extreure utilitzant el kit *QIAamp DNA Mini kit* (Qiagen, CA), i es va utilitzar el mateix protocol tant pel teixit com per les línies cel·lulars. En el cas dels teixits es va procedir trinxant-lo amb nitrogen líquid tal i com s'especifica també en l'apartat de proteïna. Per a les cèl·lules, després de tripsinitzar-les i centrifugar-les, es va guardar el *pellet*.

Tant el *pellet* cel·lular com el teixit pulveritzat es van resuspendre en el tampó ATL del kit juntament amb proteïnasa K i s'incubà a 56°C fins que quedà completament lisat.

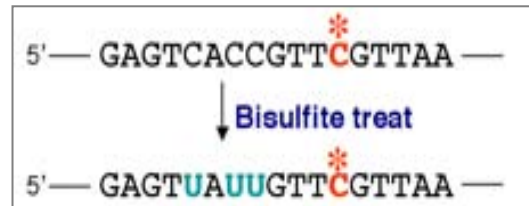
Seguidament es va afegir etanol (96-100%) i es vortejà durant 15 segons. Es va transferir el volum a una columna proporcionada pel kit i es va centrifugar a 8000 rpm durant 1 minut. Es va descartar el filtrat i es van fer els rentats amb els tampons, es va centrifugar i es va procedir a l'elució per obtenir el DNA.

Aquest es quantificà amb el NanoDrop-1000 i se'n comprovà la qualitat.



### 3.8.2 Conversió del DNA

La reacció de conversió del DNA consisteix en la conversió de tots els residus de citosina no metilats a residus de timina, per desaminació. Els residus de 5-metilcitosines, en canvi, no s'alteren amb el tractament (figura 26). La conversió del DNA s'ha fet utilitzant *EpiTect Bisulfite kit* (Qiagen), utilitzant 1-1'5 µg de DNA i seguint els passos recomanats pel fabricant. Les condicions de conversió de bisulfite a posar al termociclador es recullen en la taula següent:



**Figura 26.** Conversió del DNA; adaptada de <http://alphabiolab.com/page2/page2.html>

PAS	TEMPS	TEMPERATURA
<b>Desnaturalització</b>	5 min.	95°C
<b>Incubació</b>	25 min	60°C
<b>Desnaturalització</b>	5 min	95°C
<b>Incubació</b>	85 min	60°C
<b>Desnaturalització</b>	5 min	95°C
<b>Incubació</b>	175 min	60°C
<b>Mantenir al final reacció</b>	Indefinit	20°C

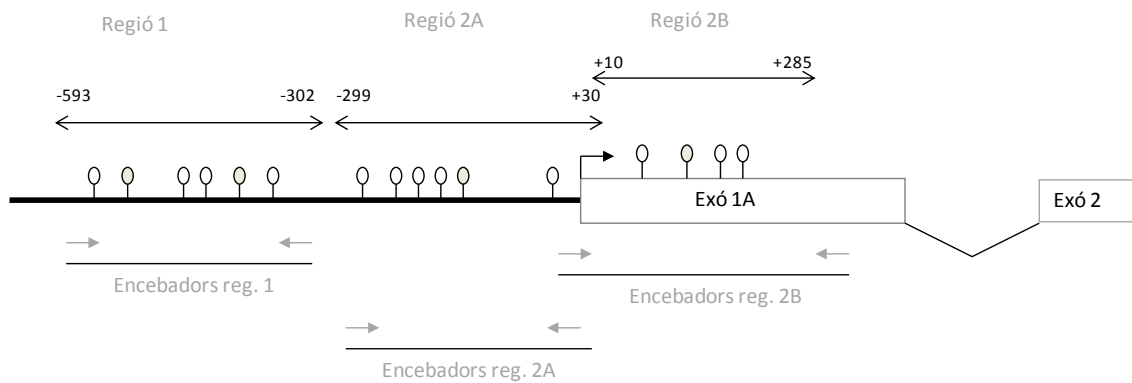
Un cop acabada la conversió, es procedí a netejar el DNA bisulfitat, es passà a la columna on es fixà i es continuà rentant amb la solució de rentat proporcionada pel kit. Finalment s'eluí el DNA bisulfitat.

A aquest DNA bisulfitat se li havia incorporat abans de la reacció de conversió al termociclador un tampó protector de DNA. Aquest tampó prevé la fragmentació del DNA associada a les altes temperatures pel tractament de bisulfite. A més a més proporciona una desnaturalització efectiva, deixant només una única cadena de DNA per a la completa conversió de les citosines.

### 3.8.3 PCR de metilació

Per a realitzar aquesta PCR es van dissenyar uns encebadors específics que reconeixien diferents parts del promotor de l'AR (figura 27, taula 4). Es van dissenyar pensant en fer una reacció de BSP utilitzant el DNA ja bisulfitat com a motlle, clonar el producte de la PCR i poder-lo seqüenciar posteriorment. Les condicions de PCR variaven en funció de l'encebador utilitzat, però seguien aquest patró:

94°C 15 minuts  
94°C 30 segons  
58-60°C 30segons  
72°C 30seg } 45 cicles  
72°C 10 minuts  
4°C ∞



**Figura 27.** Esquema del promotor de la isoforma 1A d'AR. S'ha dividit en tres regions i en cada una s'ha indicat la posició respecte de l'inici de transcripció, la localització de les illes CpG i els llocs de reconeixement dels encebadors dissenyats.

El producte de la BSP es va resoldre en un gel d'agarosa a l'1% i les bandes resultants es van retallar, es va purificar el DNA i es va clonar per seqüenciar-lo posteriorment i analitzar la quantitat d'illes metilades.

Nom	Seqüència (5' → 3')
ARreg1 (S)	GAAATGATTTTTGATTTTTGGG
ARreg1 (AS)	CACCAAATTTAATTCCAAAACC
ARreg2A (S)	GTTGGTTTTTAGGAAATTTGGA
ARreg2A (AS)	CTCCCAACAAACTAACTCCC
ARreg2B (S)	GGGAGTTAGTTTGTGGGAG
ARreg2B (AS)	CAATCCTACCAAACACTTTCC

**Taula 4.** Encebadors utilitzats en la BSP – PCR. A: encebador sentit. AS: encebador antisentit.

### 3.9 SEQÜENCIACIÓ DEL DNA

La seqüenciació es va realitzar mitjançant el mètode de Sanger, utilitzant dideoxinucleòtids derivatitzats amb fluorocroms (Big Dye, Applied Biosystems) i partint de 500 ng de DNA plasmídic (o bé de 200 ng si el producte a seqüenciar és producte directe de la PCR). Els encebadors utilitzats han estat o bé encebadors universals o bé un encebador específic de l'insert a analitzar. La reacció es va fer a les següents condicions:

94°C – 3 minuts	} 25 cicles
96°C – 10 segons	
50°C – 5 segons	
60°C – 4 minuts	
4°C – ∞	

Els productes es van analitzar per electroforesi capil·lar en un seqüenciador ABIPRISM 3100 (Applied Biosystems).

L'anàlisi de la seqüenciació es va fer utilitzant els diferents programes bioinformàtics detallats en l'apartat 3.22 d'aquesta tesi.

## 3.10 DNA RECOMBINANT

### 3.10.1 Clonatge i subclonatge de DNA

#### 3.10.1.1 Clonatge de productes de PCR

Per a la seqüenciació de productes de PCR i/o com a pas intermedi en el clonatge d'inserts (subclonatge) en vectors específics es va utilitzar el *TOPO TA cloning kit* (Invitrogen-Life Technologies). Aquest kit permet un procediment ràpid de clonació del producte de PCR en el vector utilitzant la capacitat de la Taq polimerasa no termostable d'afegir un residu de deoxiadenosina en els extrems 3' dels productes de la PCR. Això facilita la lligació en el vector pRC 2.1 (proporcionat al kit) ja que aquest presenta un residu deoxitimidina en els seus extrems 3'. Aquest vector, a més a més presenta gens de resistència a ampil·lina i kanamicina que ens permeten seleccionar aquelles *E.coli* DH5- $\alpha$  que s'han transformat, i també un fragment del gen lacZ, que codifica pels 146 primers aminoàcids de la  $\beta$ -galactosidasa. La transformació es realitzà per xoc tèrmic durant 30 segons a 42°C i immediatament després en gel, almenys durant 1 minut. Es va afegir a les cèl·lules medi SOC i es van recuperar durant 1 hora a 37°C en agitació a 225 rpm. Passat aquest temps es van sembrar en plaques de LB – ampil·lina a 100  $\mu$ g/ml o LB – kanamicina (30  $\mu$ g / mL) i es van deixar a 37°C durant almenys 12 hores per a què creïessin. Aquestes van formar colònies que es van seleccionar a l'atzar i es va comprovar si tenien o no l'insert incorporat al vector pRC2.1 realitzant una PCR de colònies amb els encebadors M13:

M13 sentit: 5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3'

M13 antisentit: 5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'

i a les següents condicions:

94°C – 10 minuts

94°C – 1 minut

55°C – 1 minut

72°C – 1 minut

72°C – 10 minuts

} 33 cicles

Les colònies seleccionades es van créixer amb medi LB – ampil·lina o LB – kanamicina a 37°C, a 225 rpm, o/n.

La clonació dels diferents productes de PCR en el vector TOPO TA clonig permet una seqüenciació senzilla d'aquests ja que gràcies als encebadors M13 obtenim una seqüència de manera més efectiva i que alhora ens permet saber si el producte clonat és específic o no. La utilització del vector pRC2.1 del kit TOPO TA clonig també és útil com a pas intermedi en un procés de clonació; el resultat negatiu en un producte de digestió directe d'un producte de PCR i posterior lligació en el vector corresponent pot comportar certa dificultat en la discriminació entre si el problema ha estat en la digestió o en la posterior lligació. El subclonatge dels inserts en el vector pRC2.1 permet separar cada procés, ja que el clonatge no depèn de les dianes de restricció, sabent així quin ha estat el pas que ha funcionat i quin no.

### **3.10.1.2 Subclonatge de DNA**

El protocol que es va seguir per al subclonatge (canviar un insert de plasmidi) va ser la digestió de l'insert i del vector, purificació del DNA de l'insert i del vector, lligació de l'insert amb el nou vector de clonatge, transformació del producte de lligació en bacteris competents i la selecció d'aquests.

#### **- Digestió**

Per a la digestió es van utilitzar els enzims de restricció, endonucleases d'origen bacterià, principalment, que reconeixien seqüències palindròmiques específiques (les dianes de restricció) tallant la cadena de DNA. Amb el tall es van originar extrems que es podien tornar a lligar mitjançant l'enzim lligasa reconstituïnt la diana de restricció. L'estratègia era digerir vector i insert amb els mateixos enzims per facilitar aquesta reconstitució de la diana en la lligació. L'origen de l'insert pot ser:

- a) Per amplificació (PCR), amb encebadors que han d'amplificar les dianes de restricció adequades en els extrems del producte d'amplificació (clonatge) (taula 5).
- b) Per digestió d'un vector preexistent (subclonatge).

La digestió de vector i insert es va fer amb els reactius i enzims de New England Biolabs Inc. (Ipswich, MA, USA) i van ser digestions seqüencials degut a diferents requeriments de reacció de cada enzim, tal i com recomanava el proveïdor.

El protocol seguit ha estat:

1. Preparació de la reacció

<b>Component</b>	<b>Concentració final</b>
<b>Aigua <i>milli-Q</i></b>	Fins a 40 µL finals
<b>DNA (insert i vector)</b>	5 - 10 µg
<b>1r enzim</b>	2 U/µg DNA
<b>Tampó 10x (específic enzim)</b>	1x

2. Incubar la reacció dues hores a 37°C

3. Preparació de la segona reacció.

Es separen 10 µL de la primera digestió per córrer al final en un gel d'agarosa. La resta s'utilitza per a la segona reacció:

<b>Component</b>	<b>Concentració final</b>
<b>Aigua <i>milli-Q</i></b>	Fins a 40 µL finals
<b>DNA (insert i vector)</b>	5 - 10 µg
<b>2n enzim</b>	2 U/µg DNA
<b>Tampó 10x (específic enzim)</b>	1x

**Taula 5. ENCEBADORS UTILITZATS EN LES CONSTRUCCIONS**

<b>Encebadors pcDNA3.1 – AR</b>	
<b>Nom i orientació</b>	<b>Seqüència (5' – 3')</b>
Exó 1D – NheI (S)	CCCGCTAGCATTAAAAATTATTCCTCACCGCAGTTGTTGA
Exó 1D – BamHI (AS)	CCCGGATCCTCACTGGGTGTGGAAATAGATGGGCTTGACTTTCCAGAA AGGATCTTG
Exó 1E – NheI (S)	CCCGCTAGCGCAGATTAGAGTCAAAAAGACCGGCCCAAT
Exó 1E – BamHI (AS)	CCCGGATCCTCACTGGGTGTGGAAATAGATGGGCTTGACTTT
T7 (S)	TATATGACTCACTATAGGG
<b>Encebadors Flag – AR</b>	
Exó 3up – HindIII (S)	CCCAAGCTTGGGATGACTCTGGGAGCCCGG
Exó 8L – BamHI (AS)	CCCGGATCCTCACTGGGTGTGGAAATAGATGGGCTTGACTTTCCAGAA AGGATCTTG
CMV30 (S)	TACAAAGACGATGACGACAAGC

4. Comprovar que la digestió era completa per electroforesi en gel d'agarosa.

- Purificació del DNA

Després de preparar el gel d'agarosa i resoldre'l a baix voltatge (60V), es van visualitzar les bandes amb llum UV i es va procedir a tallar amb una fulla de bisturí les bandes d'interès, ja fossin del vector o de l'insert digerits. Seguidament es van processar segons les indicacions del *Qiaquick Gel Extration kit* (Qiagen):

- Afegir tampó QG ( 3 volums tampó: 1 volum gel; actua de *binding buffer*)
- Incubar 10 minuts a 50°C i vortejar fins a dissoldre l'agarosa.
- Afegir el mateix volum d'isopropanol.
- Aplicar la barreja en una columna proporcionada pel kit.
- Aplicar els tampons de rentat i d'elució del DNA.

- Lligació

Un cop purificats el vector i l'insert, es va procedir a la lligació. S'utilitzà la fórmula següent per establir quina quantitat d'insert s'havia d'utilitzar en la lligació:

$$\frac{\text{Quantitat de vector (ng)} \times \text{mida insert (kb)} \times \text{relació molar}}{\text{mida del vector (kb)}} = \text{ng d'insert}$$

La reacció de lligació inclou:

Component	Concentració final
Aigua <i>milli-Q</i>	Fins a 20 µL finals
Insert i vector (en relació adequada, segons càlculs)	Fins a 16 µL
tampó T4 lligasa (NEB)	2 µL
T4 lligasa (NEB)	2 µL (400 unitats)

Es dugué a terme durant 16 hores a 16°C en un termociclador PerkinElmer 2400® (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences Inc., Boston, MA, USA).

### 3.11 BACTERIS COMPETENTS

Els bacteris competents són aquells capaços d'incorporar DNA exogen mitjançant la seva transformació. Hi ha soques comercials que ofereixen aquesta capacitat, com les One-shot® TOP10 d'*E.coli* d'Invitrogen, que s'han utilitzat en alguns experiments, o també es pot induir la competència al laboratori, com s'ha fet amb la soca bacteriana *E.coli* DH5α per a l'obtenció de grans quantitats de DNA plasmídics.

#### 3.11.1 Preparació de bacteris competents per transformar per xoc tèrmic

El tractament amb sals com el MgCl<sub>2</sub> i el CaCl<sub>2</sub> fa que les soques siguin competents per xoc tèrmic. En el protocol es van seguir els passos següents:

- Es van sembrar els bacteris de la soca escollida en plaques LB-agar sense antibiòtic i es van deixar créixer tota la nit a 37°C.
- S'inoculà un cultiu líquid de 3 mL de LB amb una colònia aïllada i es va créixer tota la nit en agitació (225rpm) i a 37°C.



- Es van preparar 250 mL de LB i s'hi van inocular 3 mL del cultiu crescut prèviament en un erlenmeyer d'un litre. S'incubà a 37°C en agitació fins que el cultiu assolí la fase exponencial de creixement ( $A_{595}=0.7-0.8$ ).
- Es centrifugà el cultiu a 4000 rpm durant 5 minuts a 4°C, i es descartà el sobrenedant.
- Es va resuspendre el *pellet* bacterià en 50 mL de MgCl<sub>2</sub> 100mM temperat a 4°C, i es va incubar en gel durant 30 minuts.
- Es centrifugà el cultiu a 4000 rpm durant 5 minuts a 4°C, i es descartà el sobrenedant.
- Es va resuspendre el *pellet* bacterià en 50 mL de CaCl<sub>2</sub> 100mM temperat a 4°C, i es va incubar en gel durant 30 - 90 minuts.
- Es centrifugà el cultiu a 4000 rpm durant 5 minuts a 4°C, i es descartà el sobrenedant.
- Es va resuspendre el *pellet* bacterià en 20 mL de CaCl<sub>2</sub> 85mM – 15% glicerol.
- Es van repartir els bacteris en alíquotes de 50 – 100 µL i es van congelar ràpidament en nitrogen líquid.
- Es van conservar els bacteris competents a -80°C.

### **3.11.2 Transformació per xoc tèrmic.**


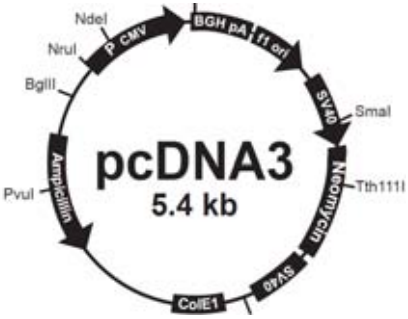
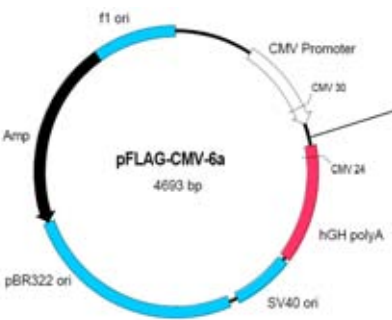
El xoc tèrmic va ser l'estratègia escollida per a la transformació de bacteris (tant pels competents generats al laboratori com pels comercials de TOPO).

El protocol a seguir va ser el següent:

1. Es descongelà en gel una alíquota de bacteris competents.
2. Es barrejà la quantitat de plasmidi desitjada amb els bacteris i es deixà durant 30 minuts en gel.
3. Es realitzà el xoc tèrmic a 42°C durant 45 segons seguit de 2 minuts en gel.
4. Es van recuperar els bacteris amb 250 mL de medi SOC durant una hora a 37°C i a 225 rpm.
5. Es va sembrar tot el volum de la transformació en una placa amb medi selectiu i es va deixar o/n a 37°C.

## 3.12 VECTORS I CONSTRUCCIONS

### 3.12.1 Vectors

VECTOR	ESPECIFICACIONS	Casa Comercial
<p><b>TOPO</b></p> 	<p>Utilitzat per clonar productes de PCR per determinar la seqüència de les isoformes de l'AR i per a realitzar subclonatge.</p>	<p>Invitrogen</p>
<p><b>pCDNA3.1</b></p> 	<p>Vector utilitzat en les construccions d'AR. El nostre insert ha de contenir una seqüència d'inici de la traducció Kozak amb el codó d'inici de la traducció ATG.</p>	<p>Invitrogen</p>
<p><b>pFLAG-CMV-6a</b></p> 	<p>Vector d'expressió utilitzat per a les construccions d'AR (mutada i no mutada) per obtenir la proteïna de fusió amb Met-FLAG a l'extrem N-terminal. La regió promotora del citomegalovirus (CMV) humà dirigeix la transcripció dels constructes amb FLAG.</p>	<p>Sigma</p>

**Taula 6.** Vectors utilitzats en les construccions, les especificacions d'aquests i la casa comercial.

### 3.12.2 Construccions

Nom	Construcció
pcDNA3.1 AR1D – 8	
pcDNA3.1 AR1E – 8	
Flag AREx3up - 8	
Flag AR- Mut	

**Taula 7.** Recull de les construccions utilitzades. S'especifica el nom, el vector utilitzat, les seqüències no traduïdes, l'inici de traducció i el codó stop. El significat de 1D i 1E s'explica en el punt 4.1.3 dels resultats de la tesi.

## 3.13 EXTRACCIÓ DE PROTEÏNA

L'obtenció de proteïna tant de les línies cel·lulars com dels teixits es va fer de diferents maneres en funció de les seves característiques (localització cel·lular, modificacions posttraduccional, etc.).

### 3.13.1 Extracció total de proteïna

Aquesta proteïna es va obtenir amb el tampó de lisi RIPA (50mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% DOC, 0,1% SDS) complementat amb còctel d'inhibidors de proteases (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich) diluït 1-500.

S'utilitzà un procediment diferent en funció del tipus de mostra de la qual volíem extreure la proteïna. En el cas dels cultius cel·lulars s'utilitzaren els *pellets* obtinguts com ja s'ha explicat prèviament en l'extracció de RNA i DNA, i en els dels teixits, es polvoritzà la mostra amb una mà de morter i nitrogen líquid, i el pols de teixit resultant era el que es pesà i amb el qual es començà a treballar.

Tant el *pellet* cel·lular com el teixit trinxat es resuspengueren amb RIPA, es vortejaren i s'homogeneïtzaren passant la solució per una agulla de 27G i xeringa d'1 mL diverses vegades fins aconseguir una consistència fluïda. Posteriorment s'agitaren durant 30 minuts a 4°C i seguidament es centrifugaren les mostres a 14000 rpm durant 10 minuts a la mateixa temperatura.

Finalment es recollia el sobrenedant (on es trobava l'extracte proteic natiu) i es va procedir a la quantificació de la proteïna.

### **3.13.2 Separació fraccions cel·lulars**

Per a la fragmentació cel·lular, un cop obtingut el *pellet* de les LNCaP en cada condició (control al 10% FBS i 7% FBS-*charcoal stripped*), es resuspengueren en 1 mL de buffer Mit (per a 50 mL: 4'27875g de sucrosa, 0'5 mL EDTA 0'1M, 0'5 mL KCl 1M, HEPES 1mL, 0'5 mL MgCl<sub>2</sub> 0'2M). La disgregació dels nuclis es va fer passant la mostra (cultiu cel·lular) entre 50-70 cops per un homogeneïtzador Teflon Dounce i després per una agulla de 27G. Aquest procés es va fer mantenint les mostres refrigerades. Un cop trencades/disgregades, es guardaren 25 µL per a córrer en el gel com a proteïna total, i la resta, es centrifugà a 1000g durant 10 minuts i a 4 °C. S'obtingué un sobrenedant (sobrenedant 1) i un *pellet*. Es va guardar el sobrenedant 1, es va rentar el *pellet* amb 30 µL de buffer Mit i es va tornar a centrifugar en les mateixes condicions. El sobrenedant 2 s'ajuntà amb el sobrenedant 1 i es guardà el *pellet*, que corresponia a la fracció nuclear. La barreja de sobrenedants es centrifugà a 12.000g durant 10 minuts a 4°C. El *pellet* obtingut era la fracció mitocondrial i el sobrenedant era el citosol i la resta d'òrgànuls. Es guardaren les dues fraccions mitocondrials (control i 7% CS-FBS) a -20°C fins al moment de fer la IP.

### 3.13.3 Quantificació

La quantificació de la proteïna és un pas important ja que ens hem d'assegurar que carreguem la mateixa quantitat de proteïna de totes les mostres i condicions per tal de poder realitzar una anàlisi comparativa i quantitativa dels nivells d'expressió d'una proteïna determinada. Per a fer-ho es va utilitzar el *RC DC Protein Assay kit* (Bio-Rad) basat en la determinació proteica pel mètode de Lowry (Lowry, Rosebrough et al. 1951).

Per a poder extrapolar els valors d'absorbància obtinguts en les mostres problema, es va preparar un banc de dilucions de BSA (0, 0'25, 0'5, 0'75, 1, 1'25, 1'5, 1'75 i 2 mg/mL) a partir del qual vam obtenir la nostra recta patró.

Tant les mostres com els punts de la recta patró es tractaren per duplicat utilitzant una placa de 96 pous.

Així doncs, als pous de la placa s'aplicaren 5 µL de la recta patró, tampó de lisi (blanc) o mostra. Seguidament s'afegiren 25 µL de la barreja de reactius A+S del kit RC DC (20 µL reactiu S en 1 mL reactiu A) i 200 µL del reactiu B. Es deixà incubar 15 minuts en foscor a temperatura ambient i, transcorregut aquest temps, es procedí a llegir l'absorbància a 690 nm utilitzant l'espectrofotòmetre *Elx800 Universal Microplate Reader* (Bio-Tek Instruments, Vermont, USA).

Un cop obtinguda la recta (a partir de la relació concentració-absorbància del banc de dilucions de BSA) amb una  $r^2 \geq 0,9$  s'interpolaren les absorbàncies de les mostres per saber a quina concentració les teníem.

Per a realitzar els experiments s'utilitzen 5-15 µg de proteïna.

## 3.14 ANÀLISI DE LES PROTEÏNES MITJANÇANT ELECTROFORESI EN GELS DE POLIACRILAMIDA (SDS PAGE) I WESTERN BLOT (WB)

Aquesta tècnica analítica consisteix en la detecció de proteïnes mitjançant l'ús d'anticossos monoclonals o policlonals utilitzant l'electroforesi en gels de poliacrilamida per separar les proteïnes en funció del seu pes molecular com a primer pas, seguit d'un segon pas que

consisteix en transferir les proteïnes a un suport membranós on es detectaran (Towbin, Staehelin et al. 1979).

### 3.14.1 Electroforesi SDS-PAGE

L'electroforesi en gels de poliacrilamida ens serveix per separar les proteïnes segons el seu pes molecular aplicant un camp elèctric ja que s'han tractat amb SDS (detergent que les desnatura i recobrint-les de càrrega negativa) i DTT (1'4 Dithiothreitol, agent reductor que trenca els ponts disulfur).

La barreja d'acrilamida/bisacrilamida polimeritza fruit d'una reacció d'oxidoreducció formant una xarxa o suport de diferent mida de porus per on migraran les proteïnes quan els hi apliquem el camp elèctric. La mida del porus és inversament proporcional a la seva concentració del gel. Per a preparar les mostres es quantifica la proteïna i es calcula el volum necessari per carregar-ne entre 5 i 15 µg, segons l'experiment. A aquest volum se li afegí el DTT (100mM concentració final) i el Laemmli buffer (1x concentració final). Es van bullir les mostres a 98°C durant 2 minuts, i un cop bullides, se'ls hi va fer un *spin* i es guardaren en gel fins a ser carregades al gel d'acrilamida. Els gels es van utilitzar al 8 i al 10% d'acrilamida (Biorad). En la següent taula hi ha els diferents components dels gels, el seu volum (en funció del percentatge d'acrilamida i per a un gel) i la seva funció, tant per al gel separador com per al gel concentrador (taules 8 i 9, respectivament).

L'electroforesi es munta després d'haver polimeritzat els gels (primer el separador, i després el concentrador) amb el sistema Mini-PROTEAN 2 de Bio-Rad. Es prepara el tampó d'electroforesi o *running buffer* (25mM Tris Base, 0'020 M glicina, 0'1% SDS (w/v)) per cobrir el sistema. Un cop cobert, es carregaren les mostres als pous i també un marcador de pes molecular comercial (Bio-Rad) i s'aplicà una diferència de potencial de 80-100 V i es deixà córrer el gel fins a la completa separació de les proteïnes d'interès (2 hores aproximadament). Es desmuntaren els gels i s'inicià la transferència o *western blot*.

**Taula 8. COMPONENTS DEL GEL SEPARADOR**

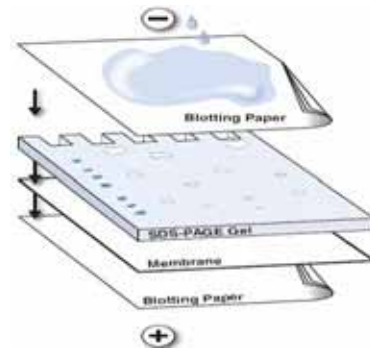
COMPONENT	FUNCIÓ	VOLUM 8%	VOLUM 10%
<b>Acrilamida/bisacrilamida 30%</b>	Acceptador d'electrons en la reacció REDOX canviant la conformació i formant una xarxa.	2,7 ml	3,3 ml
<b>Tris-HCl 1,5M pH 8,8</b>	Aporta el pH al gel	2,5 ml	2,5 ml
<b>SDS 10%</b>	Agent desnaturalitzant (aporta càrrega negativa a les proteïnes)	0,1 ml	0,1 ml
<b>Ammonium persulfate (APS) 20%</b>	Agent oxidant (donant d'electrons)	0,1 ml	0,1 ml
<b>Tetramethylethylenediamine (TEMED)</b>	Catalitzador de la reacció	0,006 ml	0,004 ml
<b>Aigua</b>		4,6 ml	4 ml

**Taula 9. COMPONENTS DEL GEL CONCENTRADOR**

COMPONENT	FUNCIÓ	VOLUM
<b>Acrilamida/bisacrilamida 30%</b>	Acceptador d'electrons en la reacció REDOX canviant la conformació i formant una xarxa.	0,83 ml
<b>Tris-HCl 1M pH 6,8</b>	Aporta el pH al gel	0,63 ml
<b>SDS 10%</b>	Agent desnaturalitzant (aporta càrrega negativa a les proteïnes)	0,05 ml
<b>Ammonium persulfate (APS) 20%</b>	Agent oxidant (donant d'electrons)	0,05 ml
<b>Tetramethylethylenediamine (TEMED)</b>	Catalitzador de la reacció	0,005 ml
<b>Aigua</b>		3,4 ml

### 3.14.2 Western blot (WB)

Es van desmuntar els gels, es deixaren equilibrar al tampó de transferència (57mM tris base, 0'44M glicina i 20% metanol) que s'utilitzà posteriorment per a la transferència (figura 28).



En aquesta segona electroforesi, les proteïnes es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa (Amersham™ Hybond™-ECL, GE Healthcare, Alemanya) quedant adherides en la mateixa posició que ocupaven al gel i així el sistema en permetí la detecció amb la incubació

**Figura 28.** Esquema del procés de *Western-blot* obtingut de [www.chemicon.com](http://www.chemicon.com)

posterior dels diferents anticossos. L'aparell que es va utilitzar era el Mini Trans blot-cell (Bio-Rad) i el procediment va ser el següent:

S'activà la membrana (tallada a la mida desitjada) en el tampó de transferència i es començà a muntar el *sandwich* de transferència (de negatiu a positiu): una esponja, 2 papers watman, el gel, la membrana, 2 papers watman i una altra esponja (vigilant de no deixar bombolles). Es va tancar el sandwich vigilant de què no es pogués cap component del muntatge. S'aplicà el camp elèctric i es deixà la transferència a 4°C durant 70 minuts a 400mA.

Un cop passat aquest temps, es desmuntà la transferència i es tenyí la membrana amb Ponceau; és un mètode ràpid per comprovar l'eficiència de la transferència ja que tenyeix les proteïnes i ens dóna una idea de si la càrrega en els diferents carrils és més o menys homogènia i si la transferència ha anat bé. El procediment a seguir va ser:

- Tenyir la membrana durant 2 minuts amb la solució Red Ponceau: Ponceau S 0'5% (Sigma-Aldrich) i àcid acètic 1%.
- Rentar l'excés de colorant amb aigua destil·lada fins que les bandes de proteïna quedin contrastades.

Després de tenyir les membranes amb Ponceau es van bloquejar amb la solució de llet descremada en pols en PBS1X – tween-20 (PBS - T) al 5% durant 1h a TA per tal de recobrir



els llocs de la membrana de nitrocel·lulosa on no hi havia proteïna. Així s'evità o es minimitzà la unió inespecífica dels anticossos a la membrana.

### 3.15 ANTICOSSOS PRIMARIS

Els anticossos primaris utilitzats en tots els experiments es van diluir amb la solució de llet descremada al 5% en PBS - T i amb ells es van incubar les membranes o/n a 4°C i en agitació. Les dilucions dels anticossos així com la casa comercial estan recollides en la taula següent:

Anticòs	Origen	Dilució	Casa comercial	Referència
<b>AR C-19</b>	Conill	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	Sc-815
<b>AR N-20</b>	Conill	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	Sc-816
<b>AR (PG-21)</b>	Conill	1:1000	Millipore	06-680
<b>PPIA</b>	Conill	1:10.000	BIOMOL Int., Madrid, Spain	SA-296
<b>p-IRS-1 (Ser639)</b>	Conill	1:500	Santa Cruz Biotechnology	Sc-101712
<b>p-S6 (Ser235/236)</b>	Conill	1:1000	Cell signaling Technology	#2211
<b>p-NFκB p65 (Ser311)</b>	Conill	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	Sc-33039
<b>Cytokeratin</b> (Clones AE1/AE3)	Ratolí	1:1000	Dako	M3515
<b>COXI</b>	Ratolí	1:2000	MitoSciences	MS604
<b>ComplexIV (COX IV)</b>	Ratolí	1:2000	MitoSciences	MS408
<b>COX Vb</b>	Ratolí	1:5000	Abcam	Ab110263
<b>Còctel mitocondrial</b>	Ratolí	1:1000	MitoSciences	MS601
<b>VDAC</b>	Ratolí	1:5000	Mitosciences	MSA03
<b>HDAC2 (clon 3F3)</b>	Ratolí	1:1000	Active Motif	39534

**Taula 10.** Relació d'anticossos primaris utilitzats en el *western blot*.

Un cop finalitzada la incubació amb el primari, la membrana es va rentar 3 cops amb PBS-T durant 5 minuts cada rentat, en agitació.

### 3.16 ANTICOSSOS SECUNDARIS

Les incubacions amb els anticossos secundaris es van fer a temperatura ambient entre 1-2h i a una dilució 1:2000 en llet descremada diluïda en PBS - T. Després d'aquesta incubació, es rentà la membrana seguint el mateix procediment que després del primari (3 rentats de 5 minuts cada un d'ells, amb PBS - T). La taula següent recull les característiques d'aquests anticossos.

Anticòs	Origen	Casa comercial	Referència
Anti-conill immunoglobulines/HRP	Cabra	Dako (Glostrup, Dinamarca)	P0448
Anti-ratolí immunoglobulines/HRP	Conill	Dako (Glostrup, Dinamarca)	P0260

**Taula 11.** Relació d'anticossos secundaris utilitzats en el *western blot*.

### 3.17 REVELAT

El revelat consisteix en obtenir en una pel·lícula fotogràfica les bandes de les proteïnes desitjades. Tots els anticossos secundaris es troben conjugats a l'enzim *horse radish peroxidase* (HRP) i amb els diferents sistemes de revelat, que consten de 2 productes, el substrat de l'enzim HRP i un *enhancer* o augmentador, s'aconsegueix un producte que emet llum augmentada. Es van utilitzar dos sistemes de revelat diferent, en funció de les característiques dels anticossos:

1. ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents (Amersham<sup>TM</sup>, GE Healthcare, Alemanya).
2. *Immobilon* (Millipore Corp., Bedford, MA).

Per a tots 2 sistemes el procediment era el mateix: es barrejaren les dues solucions del kit (substrat i augmentador) a proporció 1:1 i s'incubà la membrana amb aquesta solució durant 5 minuts. Passat aquest temps es col·locà la membrana en un *cassette* d'exposició (Hypercassette™, GE Healthcare) i en una cambra fosca, amb llum infraroja, es posà una pel·lícula radiogràfica (Amershan™ Hybond ECL Nitrocellulosa membrane) dins del *cassette*, a sobre de la membrana. El temps d'exposició de la pel·lícula (entre 30 s i 20 min) depenia de l'anticòs primari utilitzat. El processament de la pel·lícula es va fer mitjançant una màquina reveladora automàtica *FujiFilm FPM-100A* (Fuji Medical Systems, Stamford, CT, USA).

Un cop assecades, les pel·lícules es van escanejar i es va processar la imatge amb el programa *ImageJ* per tal de dur a terme la quantificació de les bandes de les diferents condicions experimentals.

### 3.18 IMMUNOPRECIPITACIÓ (IP)

Aquesta tècnica es basa en la capacitat dels anticossos de formar complexos antígen - anticòs quan són afegits a un extracte proteic. Aquests complexos es precipiten per reacció amb una fase sòlida immunoabsorbent, formada per proteïnes A o G de gran afinitat pel fragment Fc de les immunoglobulines i unides a resines insolubles (agarosa o sefarosa). Un cop sedimentats per centrifugació, els complexos es dissociaren i s'analitzaren per SDS-PAGE.

El protocol seguit va ser:

- Solubilitzar la fracció mitocondrial (el *pellet*) en PBS amb 20 mM de n-dodecil-β-D-maltopironòsid (lauril maltòsid; Sigma).
- Barrejar bé i incubar la fracció mitocondrial resuspesa en PBS – lauril maltòsid (tampó de lisi) en gel durant 30 minuts.
- Centrifugar a 16.000 g durant 30 minuts i guardar el sobrenedant.
- Afegir inhibidors de proteases (guardar la mostra en gel fins a la IP) i guardar un 10% del volum total com a *input*.

- Quantificar la proteïna (seguint el mètode explicat en l'apartat 3.13.3). En el nostre cas hem utilitzat 800 µg de proteïna per totes dues condicions.
- Equilibrar la proteïna A (Santa Cruz): es va substituir el tampó en què es trobava pel tampó de lisi mitjançant centrifugació a 2500 rpm durant 5 minuts a 4°C.
- Preaclarit: afegir 30 µL de proteïna A a la mostra (lisat) i augmentar el volum al doble amb el tampó de lisi per a afavorir la formació d'immunocomplexos. Incubar durant 4h a 4°C i en agitació.
- Centrifugar els tubs a 750g durant 3 minuts i recuperar el lisat preaclarit. Guardar el sobrenedant.
- En un altre tub (tub A), barrejar 30 µL de proteïna A amb 4 µg d'anticòs en un volum final de 400 µL en tampó de lisi. Tub control: proteïna A més IgG inespecífiques. Tots dos tubs s'incubaren durant 4 hores a 4°C i en agitació; aquest pas es va fer paral·lelament amb el preaclarit.
- Centrifugar els tubs a 750g durant 3 minuts, eliminar el sobrenedant i recuperar la proteïna A.
- Afegir el lisat del preaclarat al tub on tenim el complex resina-anticòs (tub A) i incubar o/n a 4°C i en agitació.
- Centrifugar a 750g durant 3 minuts i guardar el *pellet*, que constitueix l'immunoprecipitat (Ip). El sobrenedant és la fracció no unida (SN).
- Rentar 3 cops el Ip amb tampó de lisi.
- Resusprendre el *pellet* amb 30 µL de tampó Laemmli 2x – 10% DTT.
- Bullir les mostres a 95°C durant 5 minuts, centrifugar a 750g durant 3 minuts i recuperar el sobrenedant (així s'elimina la matriu d'agarosa).
- A la fracció no unida se li va afegir el tampó Laemmli 2x per aconseguir la mateixa concentració final que en el Ip. Bullir les mostres.

-Es poden congelar les dues fraccions (Ip i SN) o es pot procedir amb l'electroforesi SDS-PAGE.

Es va realitzar una segona IP utilitzant un anticòs contra el complex IV mitocondrial per immunoprecipitar les proteïnes endògenes que formen part del complex, i mitjançant *western blot* amb anticossos contra l'AR i contra la subunitat IV (COX IV) del complex IV vam analitzar una possible interacció. Aquesta immunoprecipitació es va fer seguint el protocol *Immunocapture* (MitoSciences). Breument, el protocol consisteix en afegir el tampó lauril maltòsid al 10% a la proteïna de la qual s'ha purificat la fracció mitocondrial, centrifugar a 16.000g durant 30 minuts i recuperar el sobrenedant. Es guardà una part d'aquest sobrenedant com a control de la proteïna no immunoprecipitada (input). A la resta de sobrenedant se li afegí la quantitat adequada d'anticòs contra el complex IV mitocondrial, ja unit a les boles d'agarosa, i es deixà la barreja (mostra més anticòs unit a les boles d'agarosa) tota la nit a 4°C. Al dia següent es va procedir a fer diferents rentats centrifugant 1 minut a 1.500g i es procedí a eluir (sobrenedant 1, 2 i 3). L'elució es va realitzar utilitzant el tampó d'urea (urea 4M i HCl pH 7.5) i es van realitzar dos rentats (dels que es va obtenir el sobrenedant 4 i el IP). Es van córrer les mostres en un gel d'acrilamida i es van transferir a una membrana de nitrocel·lulosa tal i com ja s'ha descrit a materials i mètodes.

### 3.19 IMMUNOFLUORESCÈNCIA

Aquesta tècnica ens permet detectar la localització subcel·lular de diferents proteïnes i/o molècules mitjançant l'ús d'anticossos conjugats a fluorocroms diferents. Aquests, si estan conjugats a fluorocroms que emeten a espectres diferents, ens permeten fer diferents combinacions i així aplicar la tècnica per la detecció simultània de diferents molècules en el mateix experiment podent observar fins i tot colocalització.

L'emissió de fluorescència es visualitzà amb el microscopi de fluorescència convencional BX61 de l'empresa Olympus Corporation (Tokio, Japó) i es va poder captar les imatges gràcies a la càmera incorporada en l'aparell. Mitjançant l'ús del microscopi confocal espectral FV1000 (Olympus) i el software de visionat FV-ASW es va poder localitzar les diferents proteïnes amb talls transversals i obtenir-ne imatges.

Els anticossos secundaris utilitzats es troben recollits a la taula 11.

### 3.19.1 Immunocitofluorescència

Per a iniciar aquesta tècnica s'han de sembrar les cèl·lules sobre cobreobjectes de vidre rodons (Menzel-Glaser Deckgläser, Menzel GmbH & Co., Braunschweig, Alemanya) col·locats en les plaques de cultius de 60 mm (P60). Un cop les cèl·lules estaven adherides i s'havien dividit, o després de fer el tractament desitjat, es rentaren en PBS 2 cops, es fixaren amb paraformaldehid al 4% durant 20 minuts a 4°C. El procés de fixació permet que les cèl·lules es morin però mantenint les seves propietats físico-químiques inalterades. Passats els 20 minuts es rentaren les cèl·lules en PBS dos cops. Arribat aquest punt, es podien deixar les cèl·lules a 4°C fins el moment de realitzar la immunocitofluorescència o es podia procedir amb el protocol, permeabilitzant les cèl·lules durant 10 minuts amb PBS-Tritó X-100 al 0'5% a 4°C, rentant després amb PBS durant 10 minuts i posteriorment amb la solució de bloqueig (PBS-BSA a l'1%) durant 10 minuts més, aquests dos últims passos a temperatura ambient. Per a preparar l'anticòs primari es va fer la dilució adequada amb el PBS-BSA i es col·locaren 50 µL d'aquesta dilució sobre *parafilm* en una cambra humida (per exemple, una placa de cultius de 150 mm amb paper de filtre humitejat amb PBS a la base). Llavors es va treure el cobreobjectes de la placa on s'havien rentat i fixat les cèl·lules i es col·locà sobre la gota de tal manera que fos la cara on estaven fixades les cèl·lules la que estigués en contacte amb l'anticòs; es deixà incubant o/n a 4°C. Es rentà l'excés del primari amb 2 rentats de PBS-BSA i 2 de PBS i s'incubà 1h amb el secundari a temperatura ambient, seguint el mateix procediment que amb el primari per preparar la dilució de l'anticòs. Es rentà 2 cops amb PBS-BSA i tres cops amb PBS. Es tenyí el DNA amb el Hoechst33342 o DAPI, agents que tenen afinitat pels parells de bases A-T, que ja està incorporat en el medi de muntatge comercial Vectashield® (Vector Laboratories, Inc., CA, USA). Cal guardar les mostres a 4°C i protegides de la llum.

Cal esmentar que la incubació amb diferents anticossos primaris i secundaris és possible i es pot fer de manera seqüencial o bé simultània, en funció de la reactivitat entre les diferents espècies en les quals s'ha obtingut cada anticòs.

### 3.19.2 Immunohistofluorescència

Per a dur a terme aquestes tincions immunohistofluorescents es van fer talls de blocs de parafina on s'havien inclòs els diferents teixits, després d'haver-los fixat en formol, com a mínim, durant 24h. Es començà desparafinant les mostres, passant-les per una bateria de 3 xilens durant 10 minuts cada un d'ells, seguit de la hidratació de la mostra, passant-la per alcohols a diferent concentració (2 rentats de 3 minuts per cada etanol: al 100%, al 90%, al 70%, al 50% i al 30%) i finalment per PBS, 1 rentat de 5 minuts. Es seguí amb 1 rentat de PBS-Tritó X-100 al 0'1% i dos més de PBS, tots ells de 5 minuts. Per al desemmascarament (l'exposició de l'epítip és un pas clau per a tenir la proteïna a estudiar exposada per tal que l'anticòs s'hi pugui unir) es va utilitzar el citrat comercial de Dako (Dako Target Retrieval 10x) a 1x fent bullir les mostres al microones durant 6 minuts. Es deixaren temperar fins que la temperatura arribà a 70°C (es despleguen les proteïnes) i es continuà escalfant la mostra a mínima potència (sense bullir) durant 15 minuts seguits. S'aturà l'escalfament i quan la temperatura arribà als 37°C, es rentà amb aigua mil·liQ i després amb PBS-Tritó X-100 durant 5 minuts. Es va bloquejar la mostra durant una hora amb una solució de bloqueig composta per 3% BSA, 5% FBS, 20mM MgCl<sub>2</sub> i 0,3% de Tween-20 en PBS. Un cop fet el bloqueig es va incubar la mostra o/n a 4°C amb l'anticòs primari degudament diluït en la solució de bloqueig. Anticossos, dilucions i cases comercials es recullen en la taula 12. L'endemà es va fer un rentat amb PBS-Tritó X - 100 i dos més amb PBS de 5 minuts cada un, i es procedí a la incubació amb el secundari, a temperatura ambient i durant una hora, i diluït amb la solució de bloqueig. Es procedí a fer el rentat de PBS-Tritó X – 100 i els dos de PBS i s'incubà la mostra durant 10 minuts amb el Hoechst 33342 (dilució 1:300) per a marcar els nuclis. Finalment es tornà a fer un rentat amb PBS-Tritó X – 100 i tres amb PBS i es va muntar amb PBS-glicerol (1:1) o Vectashield®.

Fluorocrom	Espècie	Dilució	Casa comercial
AlexaFluor 488	Pollastre anticonill	1/200	Molecular Probes
AlexaFluor 647	Cabra antipollastre	1/200	Molecular Probes
AlexaFluor 568	Cabra anticonill	1/200	Molecular Probes

**Taula 12.** Relació d'anticossos secundaris utilitzats per immunofluorescència.

### 3.19.3 Immunohistoquímica

Aquesta tècnica no permet l'ús de diversos anticossos a la vegada però sí facilita tenir una visió més global de la histologia. Per a realitzar la tècnica es segueix un protocol semblant a la immunohistofluorescència, però amb alguns canvis. També es necessita tenir els teixits a estudiar en un bloc de parafina per poder fer-ne talls. Els canvis els trobem després de fer el desemmascament i els rentats posteriors, on es fa una incubació amb una solució de bloqueig de la peroxidasa endògena (*Peroxidase blocking solution*, Dako) durant 10 minuts en fosc; s'ha de bloquejar la peroxidasa endògena perquè no reaccioni en el revelat i es confongui amb el marcatge específic de l'anticòs. Passat aquest temps es rentà amb PBS i es continuà amb el bloqueig de la mostra (*Background reducing solution*, Dako) durant 1h a temperatura ambient. La incubació amb l'anticòs primari es deixà o/n a 4°C, i aquest es preparà a la concentració desitjada amb la solució de bloqueig. L'anticòs secundari està conjugat a HRP enlloc de a un fluorocrom i s'incubà durant 30 minuts, a temperatura ambient. Seguidament es revelà amb el mateix sistema comercial on s'ha produït l'anticòs secundari (EnVision + System-HRP (DAB), Dako), en el qual la diaminobenzidina (DAB) provocava una reacció colorimètrica amb la peroxidasa (que ens dóna un viratge cap al marró) i així marcà els llocs d'unió del secundari, indicant així positivitat per al marcatge de la proteïna desitjada. Cal mantenir el mateix temps de revelat per a totes les mostres per poder fer comparacions en les tincions dels diferents talls. S'aturà la reacció amb aigua, es va fer la contratinció amb hematoxilina (Hematoxylin Harris, Surgipath) entre 30 segons i un minut, es rentà amb aigua abundant i es procedí a la deshidratació de la mostra seguint un gradient creixent d'alcohols (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) i per xilens. Finalment es fa el muntatge utilitzant el medi de muntatge DPX [mescla de distirè, un plastificant (tricresil fosfat) i xilè]. (Panreac, Barcelona, Espanya).

### 3.20 ANÀLISI MORFOLÒGIC: TINCIÓ HEMATOXILINA I EOSINA

La tinció amb hematoxilina – eosina és un mètode molt utilitzat que ens permet comprovar la histologia i morfologia del teixit. Consisteix en aplicar l'hematoxilina, que és bàsica, per a què tenyeixi les estructures àcides en tons blaus - liles (nuclis, per exemple), i l'eosina, que és àcida i tenyeix components bàsics de color rosa (per exemple, el citoplasma).



Per a dur a terme aquesta tinció histològica es van fer talls de blocs de parafina on s'havien inclòs els diferents teixits (tumor i altres teixits murins), després d'haver-los fixat en formol, com a mínim, durant 24h. El procés començà desparafinant les mostres, passant-les per una bateria de 3 xilens durant 10 minuts cada un d'ells, seguit de la hidratació de la mostra, passant-la per alcohols a diferent concentració (2 rentats de 3 minuts per cada etanol: al 100%, al 90%, al 70%, al 50% i al 30%) i finalment per aigua MilliQ, (1 rentat de 5 minuts) per eliminar l'excés d'alcohol.

Es van submergir les mostres en hematoxilina (Hematoxylin Harris, Surgipath) durant 1 minut, aproximadament, i es van rentar amb aigua per eliminar-ne l'excés; es continuà rentant amb aigua una estona per virar l'hematoxilina.

Es submergiren els talls en eosina groguenca a la solució de treball, es rentà amb aigua i es començà la deshidratació. Per a fer-ho, es passà per la sèrie d'etanols, aquest cop en ordre creixent, i després per xilens (3 rentats de 5 minuts). Finalment es realitzà el muntatge final amb DPX.

Cal mencionar que per a les mostres on s'ha realitzat una immunohistoquímica amb DAB, la contratinció es va fer únicament amb l'hematoxilina diluïda, fent la tinció amb aquesta just després del revelat i abans de la bateria d'alcohols en concentració creixent.

### **3.21 ANÀLISI ESTADÍSTICA.**

Per a l'anàlisi estadística es va utilitzar el *software* ezANOVA (<http://www.mccauslandcenter.sc.edu/mricro/ezanova/index.html>).

L'anàlisi de les diferències entre les mitjanes per a cada condició de tractament (en animals i en cultiu cel·lular) així com les diferències entre les mitjanes en la quantificació de proteïna i de RNA en les densitometries es va fer utilitzant l'opció "Within groups ANOVA" del citat programa; es va requerir una  $p < 0,05$  per a la significació.

Les mitjanes i desviacions estàndard de les dades procedents de les PCR quantitatives a temps real es van calcular amb el programa Microsoft Office Excel 2007.

### 3.22 BIOINFORMÀTICA

Es va utilitzar l'ajuda proporcionada per la bioinformàtica per a realitzar tot tipus de cerca a la xarxa en les diferents i variades bases de dades existents. També es va utilitzar les bases de dades de l'Institut Europeu de Bioinformàtica, EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk>) i la de Genecards del Weizmann Institute of Science (<http://www.genecards.org>).

- Per a la recerca bibliogràfica es va utilitzar:
  - a) Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Pubmed>
  - b) Google scholar: <http://scholar.google.com/>
  
- Per a la cerca de seqüències de DNA, RNA i proteïna es van utilitzar les bases de dades:
  - a) Gene: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>
  - b) AceView: [www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/)
  - c) UCSC Genome Browser: <http://genome.ucsc.edu/>
  
- Per a la cerca de possibles pautes de lectura de la proteïna es va utilitzar:  
ORF FINDER: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>
  
- Per a la comparació de seqüències es va utilitzar el Blast: Basic Local Alignment Search Tool: [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)
  
- Per a l'anàlisi de les regions promotores i illes CpG es van utilitzar:
  - a) TF Search: <http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>
  - b) TFBind: <http://tfbind.hgc.jp/>
  - c) EMBL-EBI: <http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot>
  - d) Biserach: <http://biserach.enzim.hu/>
  - e) MethPrimer: <http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>

- Per a analitzar la conservació filogenètica:  
clustalW: [www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2)
  
- Per a la predicció de l'estructura secundària del RNA:  
Mfold: <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>
  
- Per a la identificació de potencials seqüències de definició d'exons :  
ESEfinder 3.0: <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>
  
- Per a la localització de diferents inicis de transcripció en genoma humà i murí:  
Fantom4: <http://fantom.gsc.riken.jp/4/>
  
- Per a determinar noves senyals de poliadenilació alternativa:  
[www.imtech.res.in/raghava/polyapred/](http://www.imtech.res.in/raghava/polyapred/)

En tots els programes de prediccions es van mantenir les condicions predeterminades de l'algoritme o de la matriu estipulades pels creadors dels programes.

En la cerca de seqüències de l'AR de les diferents espècies per a realitzar la comparació filogenètica, així com també en la comparació de seqüències mitjançant el BLAST, es van ajustar els paràmetres de menys a més restrictius per poder realitzar una cerca més àmplia i menys discriminatòria.

## 4. RESULTATS

---



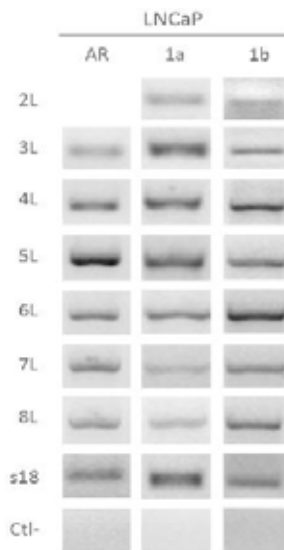
## 4.1 CARACTERITZACIÓ I EXPRESSIÓ DE LES ISOFORMES DE mRNA D'AR EN TEIXITS I LÍNIES CEL·LULARS DE CÀNCER DE PRÒSTATA

### 4.1.1 Anàlisi de l'expressió d'AR en línies cel·lulars.

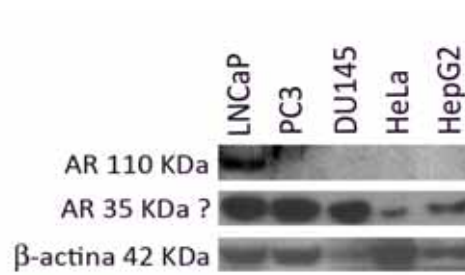
En els nostres estudis vam utilitzar la línia cel·lular LNCaP i vam comprovar que expressava AR a nivell de mRNA utilitzant la PCR semi quantitativa (PCR sq) per amplificar la seqüència completa d'AR amb encebadors que reconeixien cada un dels exons. També vam utilitzar encebadors sentit específics de cada un dels dos primers exons alternatius descrits per l'AR combinats amb encebadors antisentit de cada un dels exons comuns a totes dues isoformes (de l'exó 2 a l'exó 8). Amb les diferents amplificacions del mRNA de les LNCaP vam comprovar que expressaven l'AR, i més concretament que expressaven totes dues isoformes, la 1A i la 1B (figura 29A).

Mitjançant *western blot* i utilitzant l'anticòs ARC-19 es va voler confirmar si aquestes línies cel·lulars expressaven l'AR a nivell de proteïna. Vam veure que les LNCaP sí expressaven la proteïna d'AR, concretament la isoforma 1A, de 110 KDa. Les PC3, DU145, HeLa i HepG2 no expressaven l'AR de 110 KDa, mentre que apareixia una banda de 35 KDa aproximadament, també obtinguda en les LNCaP, que podria correspondre's amb una isoforma d'AR de menor pes molecular (figura 29B), ja que desapareixia quan s'utilitzava el pèptid de bloqueig de l'anticòs. Amb aquests resultats teníem un indici de l'existència de nous exons d'AR que podrien donar lloc a una nova proteïna.

A



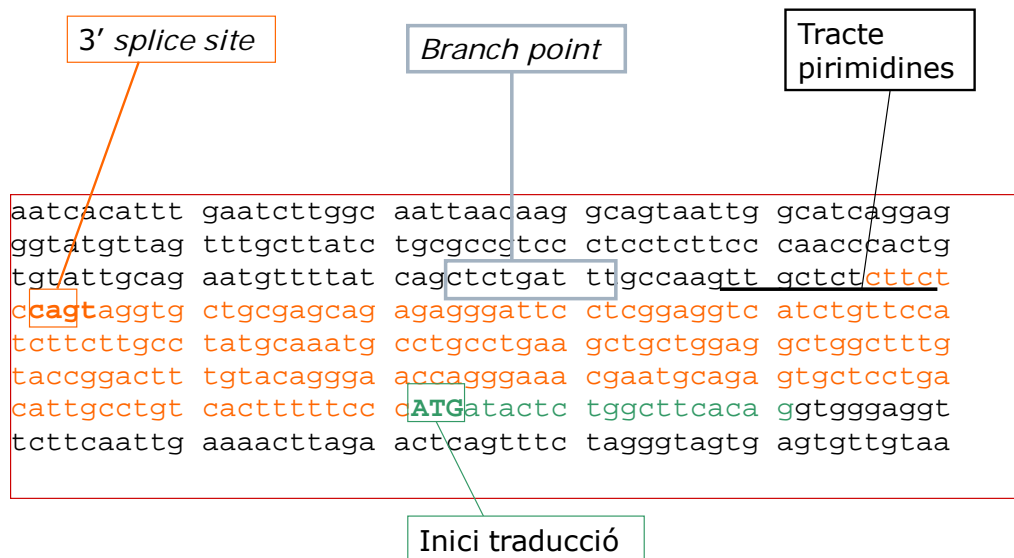
B



**Figura 29. A)** Anàlisi dels nivells de mRNA d'AR i de les isoformes 1A i 1B d'aquest en les LNCaP mitjançant PCR semiquantitativa. El gen ribosomal s18 humà s'ha utilitzat com a gen normalitzador. **B)** Anàlisi per *western blot* dels nivells de proteïna d'AR en diferents línies cel·lulars utilitzant l'anticòs antiARC-19. S'ha utilitzat la β-actina com a gen normalitzador.

#### 4.1.2 Estudi de la seqüència 5' de la isoforma 1B d'AR

Vam analitzar la seqüència 5' de l'exó 1B d'AR descrit per Ahrens-Fath i col·laboradors l'any 2005 per determinar si a més de ser un primer exó alternatiu presentava elements genòmics que suggerissin que podia ser un exó acceptor d'*splicing*. Al realitzar l'anàlisi vam observar que presentava una seqüència 3' *splice site* consens a la posició +7 i +9 (CAG), respecte de l'inici de transcripció (TSS), i una seqüència rica en pirimidines (tracte de pirimidines) en la posició -6 a +7. A més a més, presentava una seqüència consens pel *branch point*, la qual cosa significava que l'exó 1B era un possible exó acceptor d'*splicing* (Figura 30).



**Figura 30.** Anàlisi de la seqüència de l'exó 1B i la seqüència 5'adjacent. En vermell es marca el 5'UTR, en verd i en majúscules es marca l'inici de traducció descrit per Ahrens-Fath i col·laboradors l'any 2005. En negre i subratllat es marca el tracte de pirimidines. En el requadre blau, el *branch point*. El 3' *splice site* es marca en un requadre taronja.

Com que semblava que aquest exó podria ser un acceptor d'altres exons i a la literatura està descrit que la majoria de receptors nuclears presenten diferents primers exons alternatius (Mulac-Jericevic, Lydon et al. 2003; Turner and Muller 2005; Presul, Schmidt et al. 2007), vam decidir analitzar i caracteritzar millor l'extrem 5' del gen d'AR realitzant el 5'RLM RACE.

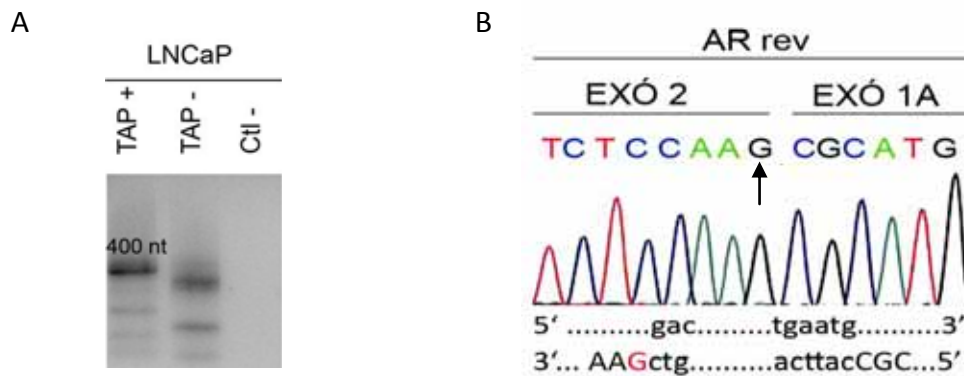
#### 4.1.3 Realització del 5'RLM-RACE

Vam utilitzar el *kit* FirstChoice® RLM-RACE per identificar trànscrips d'AR amb els extrems 5'*capped* a partir de RNA de diferents línies cel·lulars i teixits.

Amb el cDNA de la línia cel·lular LNCaP es van realitzar dues rondes d'amplificació en la PCR. En la primera, l'encebador més extern reconeixia la seqüència de l'adaptador que se li afegia al mRNA i l'encebador antisentit era específic de l'exó 5 d'AR. La segona ronda es va fer utilitzant un encebador sentit que també reconeixia la seqüència de l'adaptador, però més interna, amb un encebador antisentit de l'exó 3, específic d'AR. A la primera amplificació no es va obtenir cap banda, però en la segona ronda es va obtenir una banda de 400 nucleòtids (figura 31A). Es va retallar aquesta banda de 400 nucleòtids per un costat i la resta de



bandes menys intenses de 100 i 200 nucleòtids, aproximadament (presentes totes elles només en el tractament amb TAP+), per l'altre. Finalment aquestes bandes es van clonar i es van seqüenciar. L'anàlisi de la seqüència corresponent a la banda de 400 nt va resultar en la identificació de l'exó 1A d'AR, el ja descrit en la literatura (figura 31B). De les seqüències corresponents a les bandes menors es va obtenir un nou possible exó d'AR, l'exó 1C.

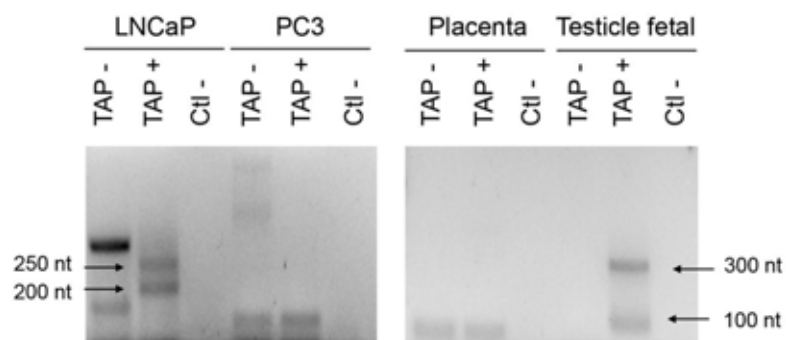


**Figura 31. A)** Amplificació, mitjançant PCR sq, del cDNA obtingut al 5'RLM-RACE per a la identificació de bandes que corresponguin a possibles nous exons d'AR en la línia LNCaP. **B)** Electroferograma de l'exó 1A d'AR trobat en el 5'RLM-RACE de les LNCaP. Es mostra la seqüència reversa (AR rev) del transcrit 1A d'AR juntament amb les unions entre l'exó 2, l'intró 1 i l'exó 1A, on les seqüència intrònica es mostra en minúscula i l'exònica en majúscula. El transcrit presenta les seqüències consens pel 3' *splice site* (ss) i pel 5' ss. S'assenyala amb un fletxa el nucleòtid G, que en aquesta posició de l'exó 2 de la seqüència NM\_000044 es correspon a una adenina (A).

Es va decidir repetir la tècnica del 5' RLM RACE amb el RNA total de les PC3, DU145, placenta i testicle fetal, obtenint un amplicó de mida més reduïda. Es van utilitzar les diferents línies cel·lulars de càncer de pròstata per no descartar cap possibilitat d'expressió de nous transcrits, ja que les LNCaP són una línia hormonodependent mentre que les PC3 i les DU145 són hormonoindependents. Es va escollir la placenta perquè era un dels teixits en els quals Arhrens –Fath i col·laboradors van comprovar l'expressió a nivell de mRNA de l'exó 1B, i també el testicle fetal, perquè el transcriptoma d'aquest mostrava una complexitat alta de més del 70% de gens expressats (Reymond, Steinert et al. 2002). Es va utilitzar també el cDNA de les LNCaP provinent del RACE anterior.

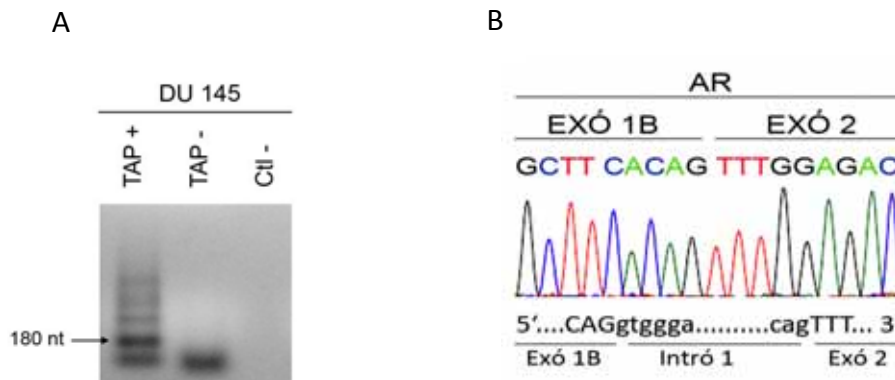
Vam repetir l'amplificació del cDNA de les línies cel·lulars i dels teixits realitzant una primera ronda amb un encebador específic extern per a l'adaptador afegit al RNA durant el RACE

conjuntament amb un encebador antisentit específic de l'exó 3 d'AR. En la segona ronda es va utilitzar un encebador sentit més intern i un encebador antisentit que reconeixia l'exó 2 de l'AR. En l'amplificació s'obtingueren diferents bandes. En les LNCaP s'escolliren les dues bandes de 300 i 210 nucleòtids cada una, resultants de l'amplificació, no presents en TAP-. En les PC3 i la placenta no es va obtenir cap banda en TAP+ que no hi fos a TAP-, i per tant, es van descartar les bandes obtingudes. En el cas del testicle fetal també s'escolliren dues bandes de 300 i 100 nucleòtids, respectivament (figura 32). Les bandes identificades es van clonar i seqüenciar. En l'anàlisi es va comprovar que la banda de 300 nt identificada en el testicle fetal corresponia a l'exó 1A d'AR, ja descrit. La banda de 100 nt era inespecífica. De les seqüències corresponents a les bandes identificades en les LNCaP es van identificar dues seqüències que podrien pertànyer a dos nous primers exons alternatius d'AR, els exons 1D i 1E.



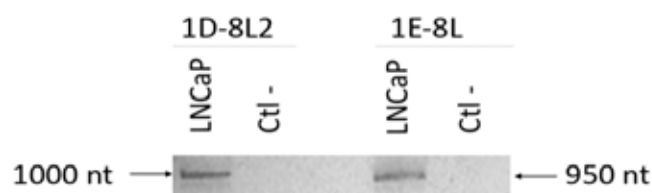
**Figura 32.** Amplificació, mitjançant PCR sq, del cDNA obtingut al 5'RLM-RACE per a la identificació de bandes que corresponguin a possibles nous exons d'AR. Es va amplificar el cDNA de les LNCaP, PC3, placenta i testicle fetal, tractats amb TAP (TAP+) o sense tractar amb TAP (TAP-).

Finalment, en les DU145 es van obtenir diferents bandes, entre les quals una de més intensa de 180 nucleòtids (figura 33A). Es van seqüenciar i analitzar totes les bandes; el resultat d'aquest anàlisi va ser la identificació de l'exó 1B d'AR, descrit el 2005 per Ahrens-Fath i col·laboradors (figura 33B).



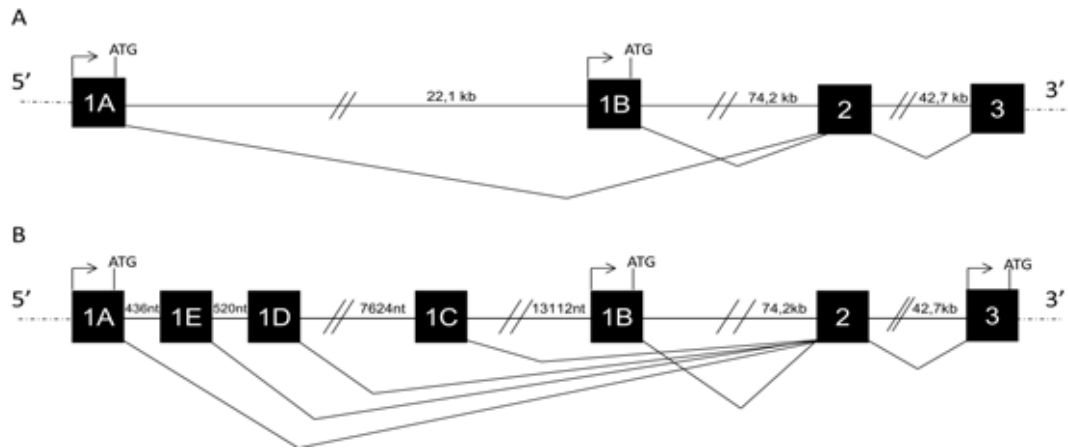
**Figura 33. A)** Amplificació, mitjançant PCR sq, del cDNA obtingut al 5'RLM-RACE en la línia DU145. **B)** Electroferograma de l'exó 1B d'AR trobat en el 5'RLM-RACE de les DU145. Es mostra la seqüència del transcrit 1B d'AR juntament amb les unions entre l'exó 1B, l'intró 1 i l'exó 2, on les seqüència intrònica es mostra en minúscula i l'exònica en majúscula. El transcrit presenta les seqüències consens pel 3' splice site (ss) i pel 5' ss (en minúscula).

Per determinar si existia el transcrit complet de les noves isoformes (de l'exó 1C, 1D o 1E fins a l'exó 8) es va amplificar el cDNA de les LNCaP, utilitzant un encebador sentit específic del primer exó amb un antisentit corresponent a l'exó 8 d'AR. Per a la possible isoforma 1C d'AR no es va aconseguir amplificar el transcrit complet, tot i que sabíem pel 5'RLM-RACE que havia d'expressar, com a mínim, fins a l'exó 5. Per a les isoformes 1D i 1E sí que es va aconseguir amplificar el transcrit complet (de l'exó 1D o 1E a l'exó 8, figura 34). Es van clonar i seqüenciar les bandes; les LNCaP expressaven tant l'exó 1D com 1E, seguits dels exons 2, 3, 4, 5, 6, 7, i 8 complint cada un dels exons amb les seqüències consens a 3' i 5' *splice site*.



**Figura 34.** Amplificació mitjançant PCR sq del cDNA de LNCaP. Es van utilitzar encebadors específics per a cada primer exó alternatiu (1D i 1E) i encebadors antisentit de l'exó 8 d'AR.

Així doncs, després de la identificació dels nous primers exons, l'extrem 5' del gen de l'AR quedava completament diferent a la que es coneixia fins al moment, degut a la identificació dels nous primers exons a l'intró 1 (figura 35).



**Figura 35. A)** Esquema de l'estructura del gen d'AR com es coneixia l'any 2005. S'han identificat els inicis de transcripció i traducció. La longitud dels introns està en kilobases (kb). **B)** Esquema de l'estructura del gen d'AR després de la identificació dels exons 1C, 1D i 1E. També s'han identificat els inicis de transcripció i traducció. La distància entre exons està en nucleòtids (nt) o kilobases (kb).

#### 4.1.4 Caracterització dels nous exons alternatius d'AR en l'extrem 5'

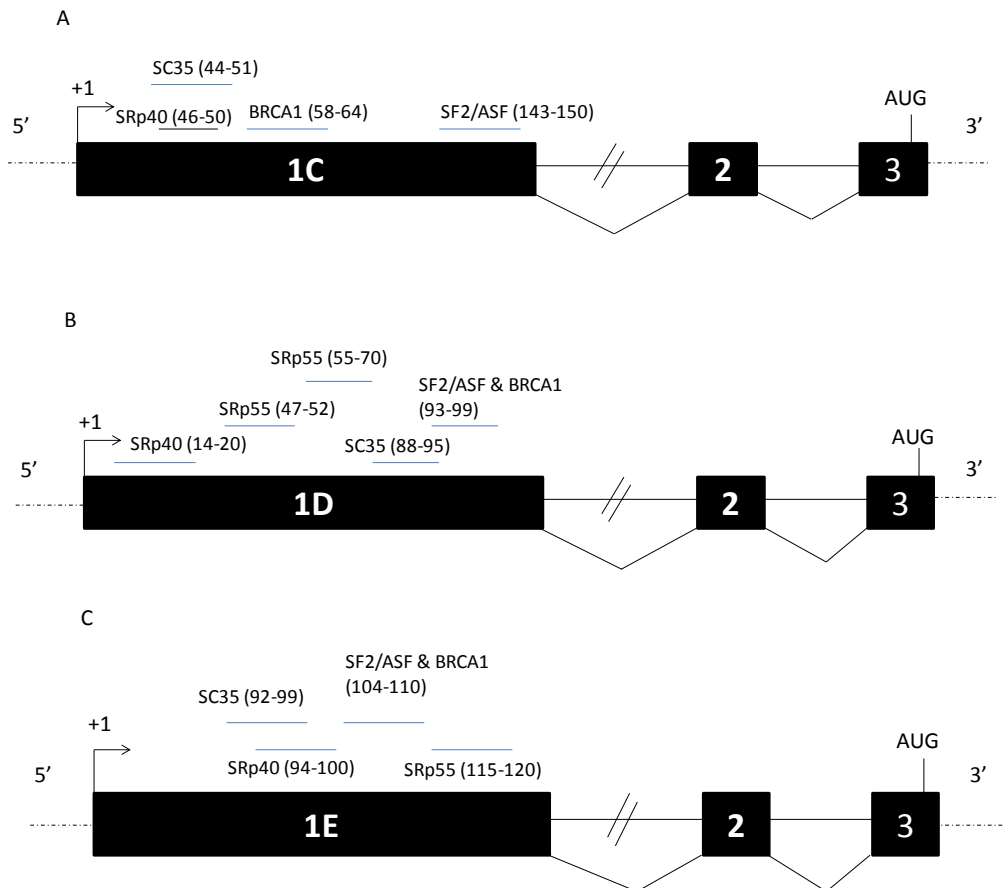
Mitjançant la tècnica del 5'RLM – RACE s'han identificat nous primers exons alternatius d'AR (1C, 1D i 1E). Aquests donen lloc a transcrits formats per aquests primers exons seguits dels exons 2, 3, 4, 5, 6, 7 i 8. Les unions entre els diferents exons era resultat d'un procés d'*splicing* on s'havien utilitzat els 5' i 3' *splice sites* consens (taula 15). Els nous exons es van estudiar més detalladament i es va determinar la seva localització en el cromosoma X del DNA genòmic. Amb el programa ESEFinder 3.0 (Cartegni, Wang et al. 2003) es va determinar si els nous exons presentaven putatius llocs d'unió de 5 proteïnes SR (SF2/ASF, IgM-BRCa-1, SC35, SRp40 i SRp55). També es va comprovar, mitjançant el programa ORF Finder si presentaven un codó ATG en pauta i la possible mida de la proteïna. Després d'aquesta anàlisi es va determinar la llargada dels 5'UTR, l'estabilitat de l'estructura secundària dels 5'UTR de les 3 isoformes noves així com també de les dues ja descrites (1A i 1B), per tal de

predir la traduïbilitat de les 3 noves i comparar l'estabilitat amb les ja existents. Tota la informació de la caracterització dels nous exons es troba recollida en la taula 15.

En la predicció dels potencials llocs d'unió per a les seqüències de les proteïnes SR mitjançant l'ESE Finder vam trobar que tant per 1C, 1D com per 1E la puntuació obtinguda en els algorismes que calculen aquests possibles lloc d'unió de les proteïnes SR era superior a la del valor llindar establert en les matrius (taula 13). Aquests resultats reforçaven l'existència d'aquests nous exons. A la figura 36 es mostren els putatius llocs d'unió de les 5 proteïnes per a cada exó.

ISOFORMA	PROTEÏNA SR	SCORE	THRESHOLD
<b>1C</b>	SF2/ASF	3.96044	1.956
	IgM-BRCA1	3.71272	1.867
	SC35	3.80060	2.383
	SRp40	3.79704	2.67
	SRp55	3.63097	2.676
<b>1D</b>	SF2/ASF	3.88944	1.956
	IgM-BRCA1	3.94509	1.867
	SC35	2.92339	2.383
	SRp40	3.77218	2.67
	SRp55	2.65279	2.676
<b>1E</b>	SF2/ASF	4.26298	1.956
	IgM-BRCA1	4.15276	1.867
	SC35	5.12349	2.383
	SRp40	5.03140	2.67
	SRp55	2.82087	2.676

**Taula 13.** Recull dels resultats obtinguts en el programa ESEfinder (Cartegni et al., 2033). Es mostra el valor llindar (*threshold*) i el valor obtingut en la predicció (*score*) dels llocs d'unió de les 5 proteïnes SR en els tres exons alternatius d'AR.



**Figura 36.** Representació gràfica de la posició dels possibles llocs d'unió de les 5 proteïnes SR en la seqüència dels primers exons alternatius trobats mitjançant ESEfinder (Cartegni et al., 2033) per a l'exó 1C (A), per a l'1D (B) i per a l'1E (C).

#### 4.1.4.1 Exó 1C

A l'analitzar l'exó 1C vam determinar que tenia una longitud de 141 nucleòtids i presentava les seqüències 5' i 3' *splice site* consens (taula 15, figura 41A). Mitjançant l'anàlisi de l'exó en el programa *Open Reading Frame finder* (ORF) no vam obtenir cap ATG en pauta amb el marc de lectura, és a dir, aquest exó 1C no presentava un codó d'inici de la traducció de l'AR. Els trànscrips que comencen amb aquest exó 1C presentaven el primer ATG en pauta a l'exó 3 (posició respecte inici transcripció: +398; posició en el genòmic: 66822681). Per tant, en aquests trànscrips tant l'exó 1C, com l'exó 2 i part de l'exó 3 (fins a l'inici de la traducció) eren una seqüència 5'UTR. Seguidament vam analitzar el codó d'inici de la traducció localitzat en l'exó 3 per veure si complia la seqüència Kozak consens (gccgcc(A/G)ccAUGG), i vam comprovar que aquest presentava una seqüència semi Kozak, és a dir, complia un dels 2

critèris més importants (presentar una A o una G en la posició -3 o bé una G a la posició +4; en el nostre cas, presentava una G a la posició -3; taula 14). La proteïna resultant d'aquests trànscrips estaria formada per 296 aminoàcids i el seu pes seria de 35 KDa aproximadament (figura 37). La seqüència 5'UTR dels trànscrips iniciats amb l'exó 1C presentava una llargada de 397 nucleòtids. Posteriorment vam analitzar si aquesta seqüència presentava possibles elements reguladors de la traducció tals com uAUGs, si era una seqüència rica en GC, si tenia una estructura secundària estable de la seva seqüència de mRNA fins al codó d'inici de la traducció (tots aquests elements dificultarien el procés d'*scanning* de la subunitat petita del ribosoma) o bé si presentava una seqüència 5'TOP. A l'estudiar la composició de nucleòtids d'aquesta seqüència es va veure que no presentava seqüència 5' TOP i que el percentatge de GC era del 52,48% així com també vam observar la presència de 8 uAUGs que donaven lloc a polipèptids en un rang entre els 3 i els 26 aminoàcids. Amb el programa MFOLD es va calcular l'estabilitat de l'estructura secundària del 5'UTR, obtenint que la seqüència 5' UTR dels trànscrips iniciats amb l'exó 1C presentava una energia lliure de -121.20 kcal/mol (figura 40).

Amb la classificació CART (*classification and regression trees*) vam obtenir que aquesta seqüència es classificaria com una seqüència classe I, és a dir, una seqüència amb uns nivells baixos de traducció (taula 15).

#### 4.1.4.2 Exó 1D

L'exó 1D tenia una llargada de 132 nucleòtids i presentava seqüències 5' i 3' *splice sites* consens (taula 15, figura 41B). En l'anàlisi de l'exó 1D mitjançant l'ORF finder vam observar que aquest exó no presentava cap ATG en pauta amb el marc de lectura de la proteïna d'AR. En els trànscrips que comencen amb l'exó 1D (trànscrips de 1715 nucleòtids) el primer ATG en pauta es trobà en l'exó 3 (posició respecte inici transcripció: +389; posició en el genòmic: 66822681). Així doncs, en aquests trànscrips l'exó 1D, l'exó 2 i part de l'exó 3 (fins al codó d'inici de la traducció) eren una seqüència 5'UTR. La proteïna resultant dels trànscrips iniciats amb l'exó 1D estaria formada per 296 aminoàcids i el seu pes seria de 35 KDa aproximadament ja que l'inici de traducció dels trànscrips 1D coincidia amb l'inici de traducció dels trànscrips iniciats l'exó 1C (figura 37). Així doncs, aquest codó d'inici de la

traducció en l'exó 3 compleix amb una seqüència semi Kozak, tal i com s'ha detallat en els trànscrips iniciats per l'exó 1C (taula 14). La seqüència 5'UTR dels trànscrips iniciats amb l'exó 1D presentava una llargada de 388 nucleòtids. Posteriorment també vam analitzar si aquesta seqüència presentava possibles elements reguladors de la traducció i vam observar que no presentava seqüència 5'TOP, presentava un percentatge de GC del 38,63% així com també vam observar la presència de 7 uAUGs que donaven lloc a polipèptids en un rang entre els 3 i els 54 aminoàcids. Amb el programa MFOLD vam obtenir que la seqüència 5' UTR dels trànscrips iniciats amb l'exó 1D presentava una energia lliure de -105,04 kcal/mol (figura 42).

Mitjançant la classificació CART vam classificar la seqüència 5'UTR com una seqüència classe I, és a dir, una seqüència amb uns nivells baixos de traducció (taula 15).

#### **4.1.4.3 Exó 1E**

Finalment vam determinar que l'exó 1E tenia una llargada de 154 nucleòtids i presentava seqüències 5' i 3' *splice sites* consens (taula 15, figura 41C). A l'igual que els exons 1C i 1D, l'exó 1E no presentava cap ATG en pauta, i el codó d'inici de la traducció en pauta es trobà en l'exó 3 (posició respecte inici transcripció: +431; posició en el genòmic: 66822681). Així doncs, en aquests trànscrips, l'exó 1E, l'exó 2 i part de l'exó 3 (fins al codó d'inici de la traducció) eren una seqüència 5'UTR. La mida de la proteïna resultant dels trànscrips iniciats amb l'exó 1E (1757 nucleòtids) seria de 35 KDa aproximadament i estaria formada per 296 aminoàcids (figura 37), i tal i com passava amb els trànscrips 1C i 1D, aquest codó presentava una seqüència semi Kozak (taula 14). Tots tres trànscrips, doncs, donarien lloc a la mateixa proteïna. La seqüència 5'UTR dels trànscrips iniciats amb l'exó 1E presentava una llargada de 430 nucleòtids, no presentava seqüència 5'TOP, el percentatge de GC era del 36,78% i presentava 5 uAUGs que donaven lloc a polipèptids entre 3 i 54 aminoàcids.

Amb el programa MFOLD es va obtenir que la seqüència 5'UTR dels trànscrips iniciats amb l'exó 1E presentaven una energia lliure de -212.7 kcal/mol (figura 43).

Amb la classificació CART vam obtenir que aquesta seqüència es classificaria com una seqüència classe I, és a dir, una seqüència amb uns nivells baixos de traducció (taula 15).



Cal esmentar també que en algunes línies cel·lulars, com en les LNCaP, i en la pròstata, a l'amplificar per PCR semiquantitativa l'exó 1E es va obtenir una doble banda. Al seqüenciar-les i analitzar-les les dues es corresponien a l'exó 1E amb dos 5' *splice sites* diferents, un més intern que l'altre. En ambdós casos, l'exó 1E estava seguit de l'exó 2 utilitzant la seva seqüència 3' *splice site* consens (figura 41D).

1A → ATG in frame → 920 aa → 110 kDa	
1B → ATG in frame → 388 aa → 46 kDa	
1C → no ATG in frame	} 296 aa → 35 kDa (ATG a l'exó 3)
1D → no ATG in frame	
1E → no ATG in frame	

**Figura 37.** Resum dels codons d'inici de la traducció de cada isoforma d'AR i de la mida de la proteïna per la que codifiquen.

ISOFORMA	SEQÜÈNCIA KOZAK (gccgcc(A/G)ccAUGG)
1A	<sup>-3</sup> aggA <sup>+1</sup> TGG
1B	<sup>-3</sup> cccA <sup>+1</sup> TGA
1C, 1D, 1E	<sup>-3</sup> gggA <sup>+1</sup> TGA

**Taula 14.** Anàlisi del codó d'inici de la traducció de cada isoforma per comprovar que compleixen la seqüència Kozak consens.

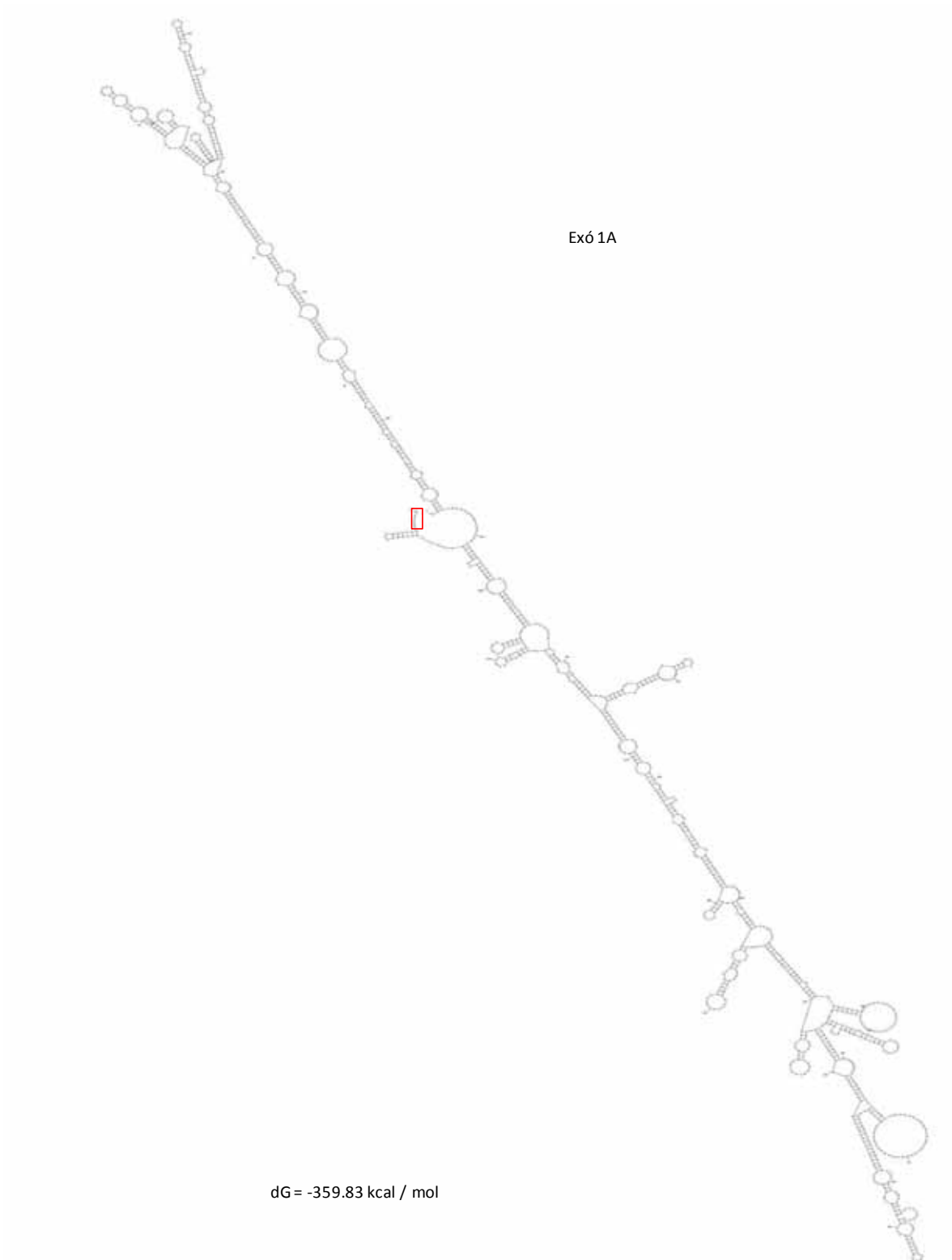
Un cop descrita l'existència dels nous exons que donen lloc a 3 nous trànscrips es va voler analitzar també les altres dues isoformes d'AR, AR 1A i AR 1B. Per tant, es van caracteritzar els mateixos paràmetres que en les isoformes 1C, 1D i 1E. Entre totes les característiques estudiades, a l'analitzar la seqüència Kozak dels codons d'inici de traducció de cada una de les dues isoformes vam obtenir que la isoforma 1A presenta una seqüència Kozak consens (presentava una A en la posició -3 i una G en la posició +4), mentre que la 1B no la

presentava (taula 14). Es va calcular també l'estabilitat de l'estructura secundària d'1A (figura 38) i d'1B (figura 39).

Totes les característiques dels primers exons alternatius d'AR humà es troben recollides en la següent taula (taula 15).

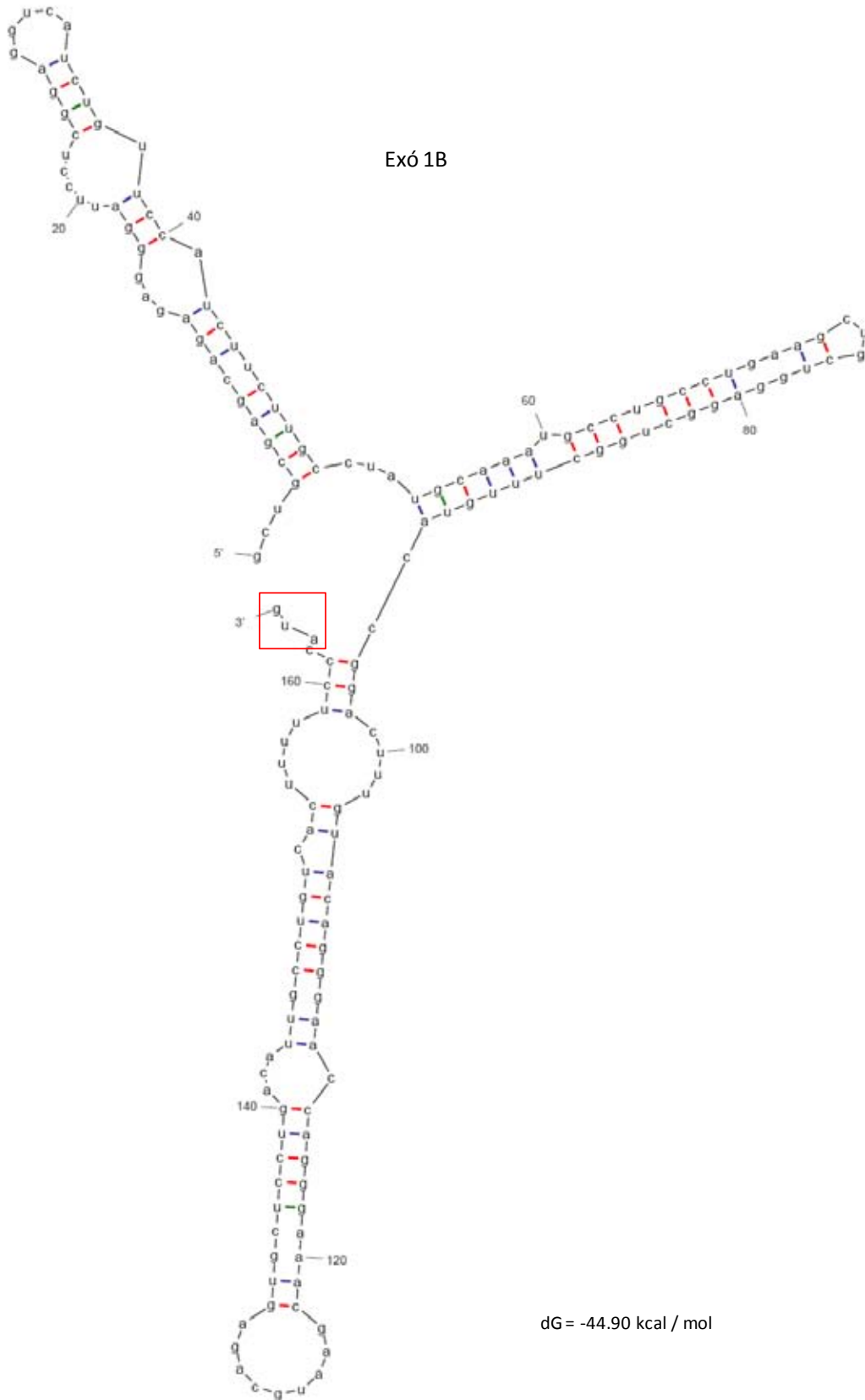
	<b>Exó 1<sup>a</sup></b>	<b>Exó 1B</b>	<b>Exó 1C</b>	<b>Exó 1D</b>	<b>Exó 1E</b>
<b>Posició en genòmic (NC_000023.10)</b>	ChrX: 66680599 - 66683329	ChrX: 66705408 – 66705589	ChrX: 66692255 – 66692395	ChrX: 66684460 – 66684591	ChrX: 66683766 - 66683939
<b>Cadena</b>	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
<b>Llargada 5'UTR (nt)</b>	1115	162	397	388	430
<b>uATG</b>	1	2	8	7	5
<b>5'splite site</b>	CG/gtaagt	AG/gtggga	TG/gtgagc	AG/gtaggc	AG/gtcagt
<b>Estructura secundària (MFOLD) Kcal/mol</b>	-359.83	-44.9	-121.20	-105.04	-121.7
<b>5'TOP</b>	No	No	No	No	No
<b>CART</b>	Classe I	Classe I	Classe I	Classe I	Classe I
<b>Mida proteïna</b>	110 KDa	45 KDa	35 KDa	35 KDa	35 KDa

**Taula 15.** Caracterització dels primers exons alternatius (1A, 1B, 1C, 1D i 1E) d'AR en humans.

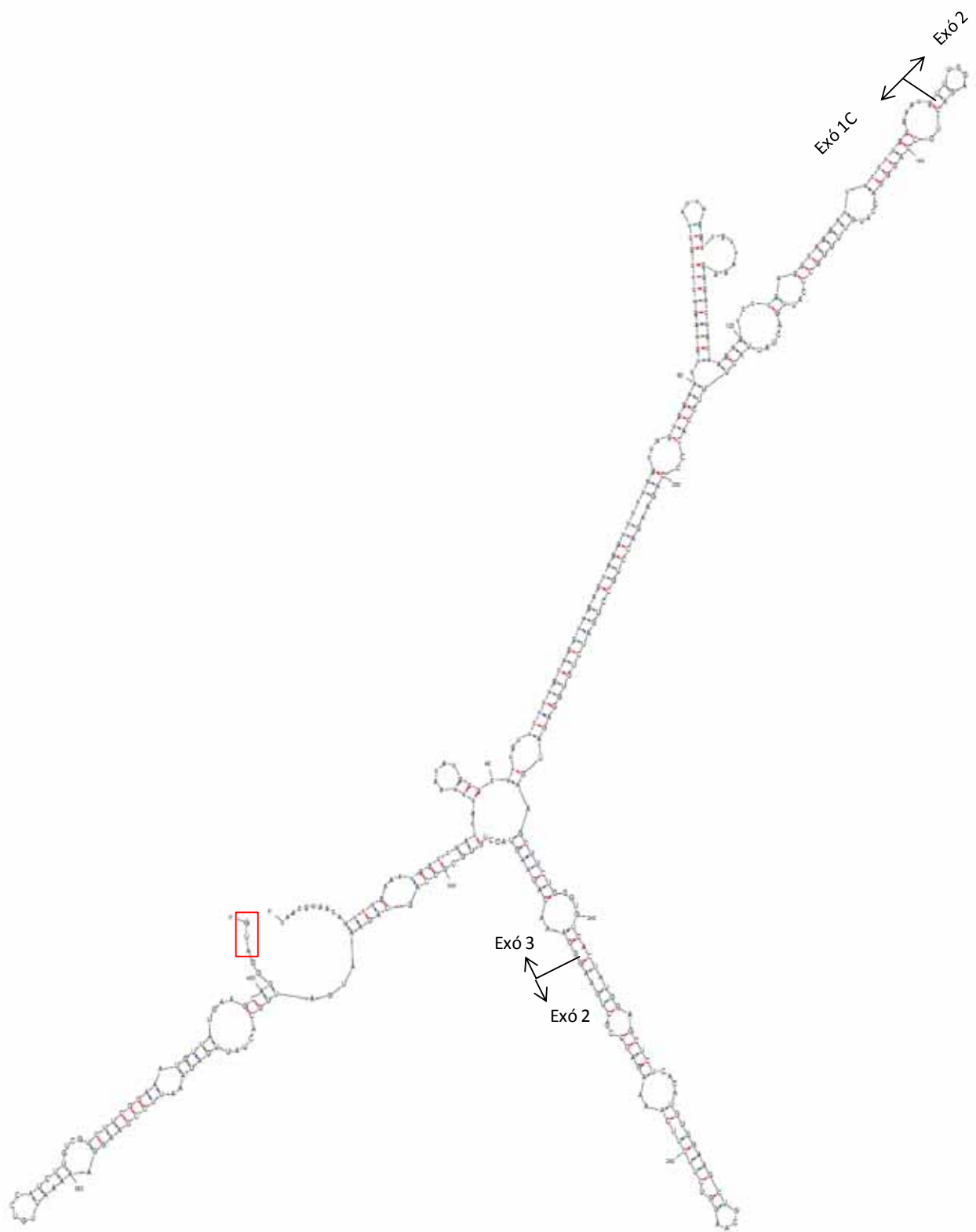


**Figura 38.** Predicció de l'estructura secundària de la seqüència 5' UTR del transcrit que s'inicia amb l'exó 1A. S'ha requadrat en vermell el codó d'inici de la traducció. Segons el programa MFOLD, l'estructura secundària d'aquesta seqüència 5'UTR és de -359.83 kcal/mol).

Exó 1B

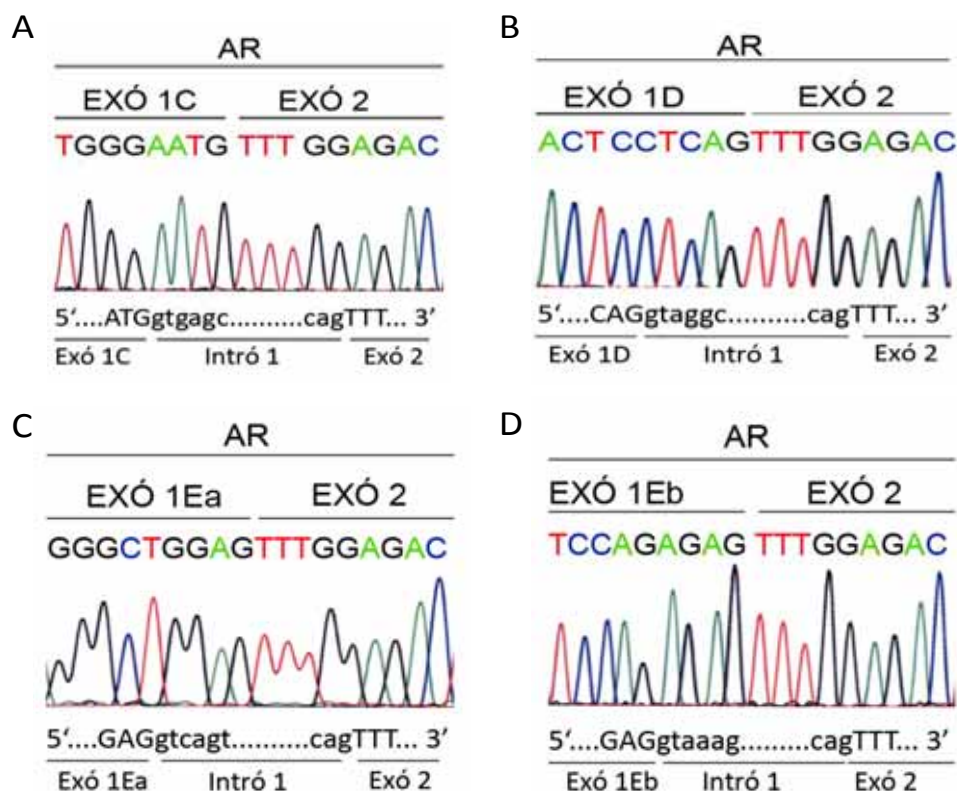


**Figura 39.** Predicció de l'estructura secundària de la seqüència 5'UTR del transcrit que s'inicia amb l'exó 1B. S'ha marcat en vermell el codó d'inici de la traducció. Segons el programa MFOLD, l'estructura secundària d'aquesta seqüència 5'UTR és de -44.90 kcal/mol.

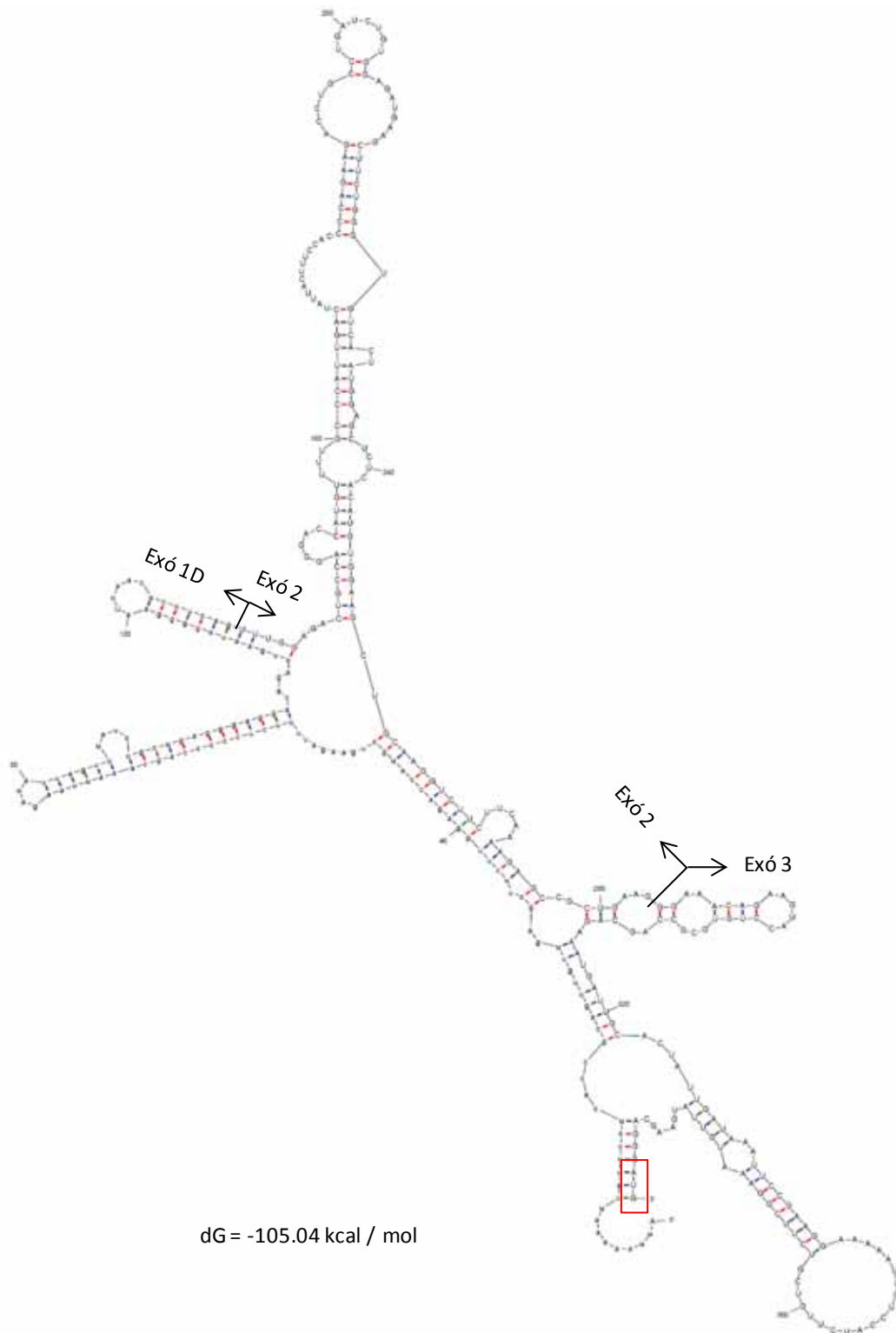


dG = -121.20 kcal / mol

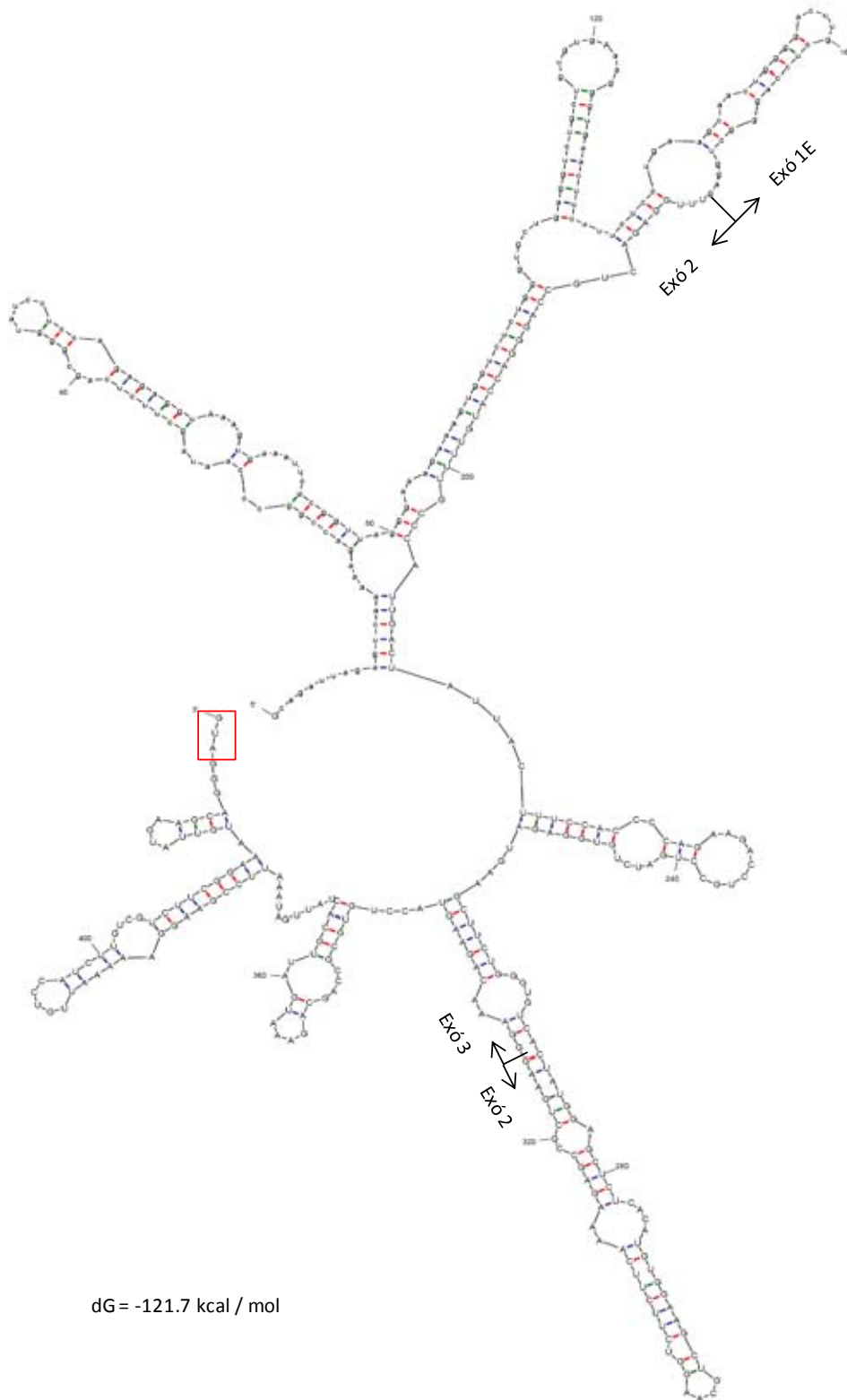
**Figura 40.** Predicció de l'estructura secundària de la seqüència 5'UTR del transcrit que s'inicia amb l'exó 1C. S'han marcat a la seqüència els exons 1C, 2 i 3. S'ha requadrat en vermell el codó d'inici de la traducció. Segons el programa MFOLD, l'estructura secundària d'aquesta seqüència 5'UTR és de -121.20 kcal/mol.



**Figura 41.** Electroferogrames dels nous exons alternatius d'AR trobats en el 5'RLM-RACE de les LNCaP. **A)** Es mostra un fragment de la seqüència del transcrit 1C d'AR i de l'exó 2, juntament amb les unions entre l'exó 1C, l'intró 1 i l'exó 2. **B)** Electroferograma d'un fragment de l'exó 1D unit a l'exó 2, juntament amb les unions entre l'exó 1D, l'intró 1 i l'exó 2. **C i D)** Es mostren els electroferogrames de l'exó 1E unit a l'exó 2, així com també els punts d'unió entre l'exó 1E, l'intró 1 i l'exó 2. En **D)** la seqüència mostra el segon 5' *splice site* de l'exó 1E (1Eb). En **A, B, C i D** es mostren les seqüències intròniques en minúscula i les exòniques en majúscula. Els transcrits presenten seqüències consens pels 3' *splice site* (SS) i



**Figura 42.** Predicció de l'estructura secundària de la seqüència 5'UTR del transcrit que s'inicia amb l'exó 1D. S'han marcat a la seqüència els exons 1D, 2 i 3. S'ha requadrat en vermell el codó d'inici de la traducció. Segons el programa MFOLD, l'estructura secundària d'aquesta seqüència 5'UTR és de -105.04 kcal/mol.

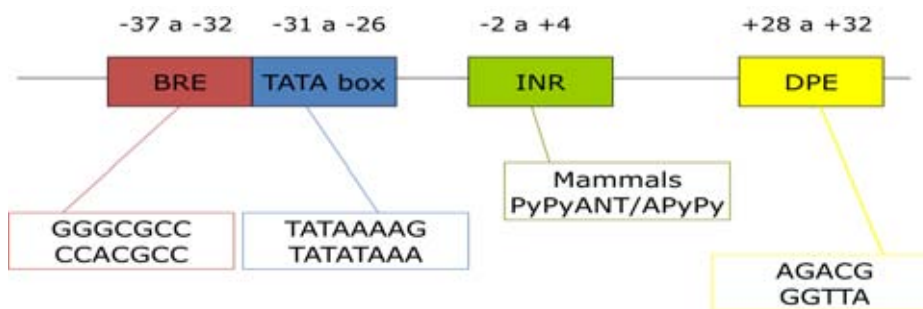


**Figura 43.** Predicció de l'estructura secundària de la seqüència 5'UTR del transcrit que s'inicia amb l'exó 1E. S'han marcat a la seqüència els exons 1E, 2 i 3. S'ha requadrat en vermell el codó d'inici de la traducció. Segons el programa MFOLD, l'estructura secundària d'aquesta seqüència 5'UTR és de -105.04 kcal/mol.

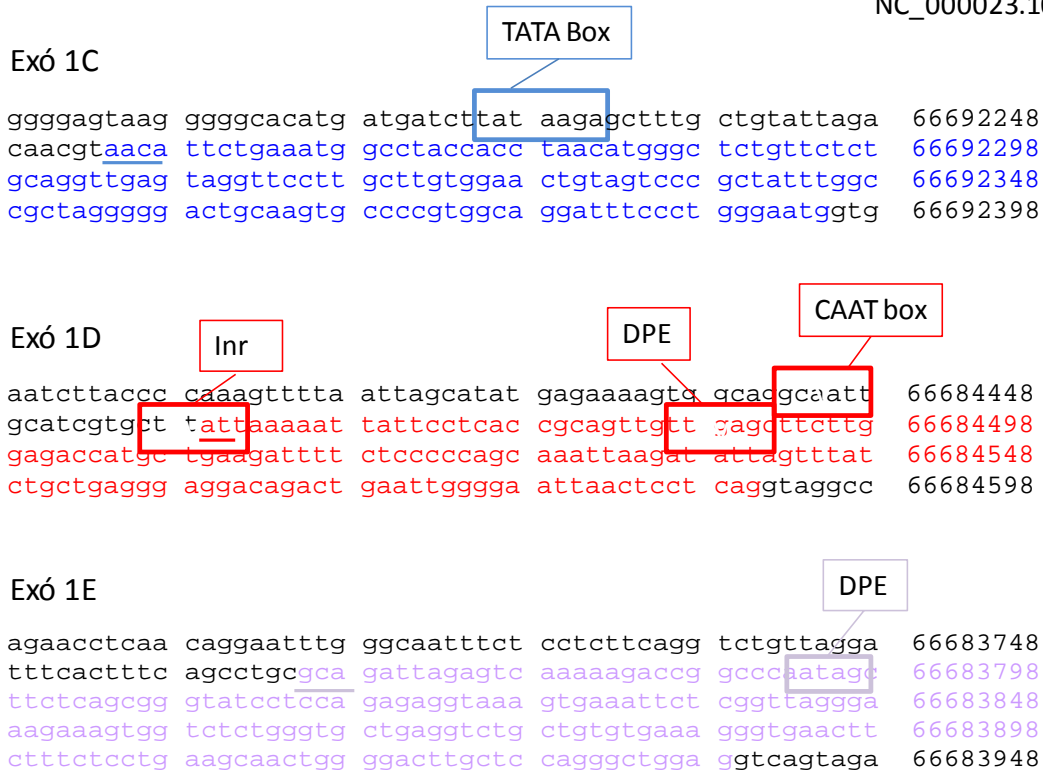


Posteriorment vam analitzar la seqüència que precedeix a l'extrem 5' dels exons identificats per tal de determinar si presentava les seqüències clàssiques d'un *core promoter*, on s'uneixen les proteïnes que constitueixen la maquinària basal de transcripció.

Seguint l'esquema de Smale i Kadonaga (Smale and Kadonaga 2003) (figura 44) vam poder identificar que el transcrit 1C presentava una caixa TATA de la posició -23 a la -29, però no presentava cap altre element regulador. El transcrit 1D presentava l'element DPE, així com l'element iniciador *Inr*, però no presentava caixa TATA ni l'element BRE. Semblava, però, que podria tenir una seqüència per a la caixa CAAT. El transcrit 1E no presentava caixa TATA, ni seqüències *Inr* ni BRE. Semblava, però, que presentés l'element DPE (figura 45). Després de fer l'anàlisi de les seqüències que precedeixen l'inici de transcripció dels exons 1D i 1E i veure que no presentaven regulació per la caixa TATA, vam voler comprovar si el control de la transcripció podria estar regulat per illes CpG. Es va fer l'anàlisi mitjançant diferents programes de predicció d'illes CpG en les regions promotores, UCS Genome Browser i com a resultat de la predicció *in silico* vam obtenir que cap dels dos transcrits (1D i 1E) presentava illes CpG en el seu promotor proximal.



**Figura 44.** Regió *core promoter* dels gens eucariotes. Esquema dels promotors eucariotes amb les principals seqüències reguladores on es pot articular la maquinària basal de transcripció. BRE: *TFIIB Recognition Element*. DPE: *Downstream core Promoter Element*. Inr: seqüència on acostuma a produir-se l'inici de transcripció. Adaptat i modificat de Smale i Kadonaga, 2003.



**Figura 45.** Identificació dels diferents elements del *core promoter* dels gens eucariotes en els nous transcrits d'AR (1C, 1D i 1E). En tots ells s'han requadrat les possibles seqüències dels elements reguladors on s'uneix la maquinària de transcripció i s'hi ha subratllat l'inici de transcripció.

#### 4.1.5 Comparació filogenètica dels primers exons alternatius d'AR

Es va fer una cerca en les bases públiques per tal d'identificar en diferents espècies (classificades en la taula 16) exons ortòlegs dels nous primers exons d'AR humans. Es van fer les comparacions filogenètiques de l'exó 1A (part codificant i no codificant) i de l'exó 1B (tots dos descrits prèviament a la literatura), dels exons 1C, 1D i 1E (identificats mitjançant 5'RLM RACE al nostre grup), dels exons 2 i 3 i també dels introns (intró entre 1A i 1E, entre 1E i 1D, entre 1D i 1C i entre 1C i 1B). Es recull tota aquesta informació en les taules 16 i 17.

**Taula 16. Comparació filogenètica dels exons humans d'AR**

VERTEBRATS		EXONS							
Mamífers	ESPÈCIE	1A	1E	1D	1C	1B	2	3	
		UTR	CODING						
	<i>Homo sapiens</i>	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	
	<i>Pan troglodytes</i>	93%	98%	99%	100%	100%	99%	100%	
	<i>Macaca mulatta</i>	97%	97%	94%	96%	97%	96%	98%	
	<i>Bos taurus</i>	81%	87%	76%	79%	84%	0	92%	
	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	41%	87%	0	0	0	0	96%	
	<i>Mus musculus</i>	79%	70%	0	0	0	0	94%	
No mamífers	ESPÈCIE								
	<i>Gallus gallus</i>	0	74%	0	0	0	0	82%	
	<i>Xenopus laevis</i>	0	83%	0	0	0	0	86%	
	<i>Dario rerio</i>	0	0	0	0	0	0	81%	
INVERTEBRATS	ESPÈCIE								
	<i>Drosophila melanogaster</i>	0	0	0	0	0	0	0	

A l'analitzar els resultats de les comparacions filogenètiques dels exons 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 2 i 3 vam poder observar com l'homologia de tots ells entre els humans i els primats era gairebé del 100% (taula 16). Al comparar les seqüències dels exons humans amb les seqüències dels exons del brau vam comprovar que el percentatge de similitud entre elles també era molt elevat, excepte per a l'exó 1B, pel qual no vam trobar cap similitud al comparar les seqüències genòmiques (taula 16). Quan vam analitzar els resultats obtinguts en el cas del conill i del ratolí vam observar com totes dues espècies presenten una similitud de seqüència molt elevada amb els humans en el cas dels exons 2 i 3 d'AR (més del 90%). Al comparar la seqüència de la part codificant de l'exó 1A humà amb les seqüències genòmiques del conill i del ratolí vam obtenir un 87% i un 70% d'homologia, respectivament. Al comparar la part no codificant de l'exó 1A d'humà amb les del conill i ratolí vam trobar una similitud del 41% i del 79%, respectivament. Ni el ratolí ni el conill presentaven cap similitud de seqüència amb la humana per als exons 1B, 1C, 1D i 1E (taula 16).

L'anàlisi del grup dels no mamífers va donar lloc a comprovar que el peix zebra només presentava similitud amb l'exó 2 i 3 d'AR humans, i no en presentava cap homologia dels primers exons alternatius; el gall i la granota presentaven una homologia dels exons 2 i 3 d'AR de més del 80% amb les seqüències exòniques humanes, així com també presentaven semblances del 74% i del 83%, respectivament, amb la part codificant de l'exó 1A humà (taula 16).

La mosca de la fruita no presentava cap seqüència semblant a la seqüència del gen d'AR humà (taula 16).

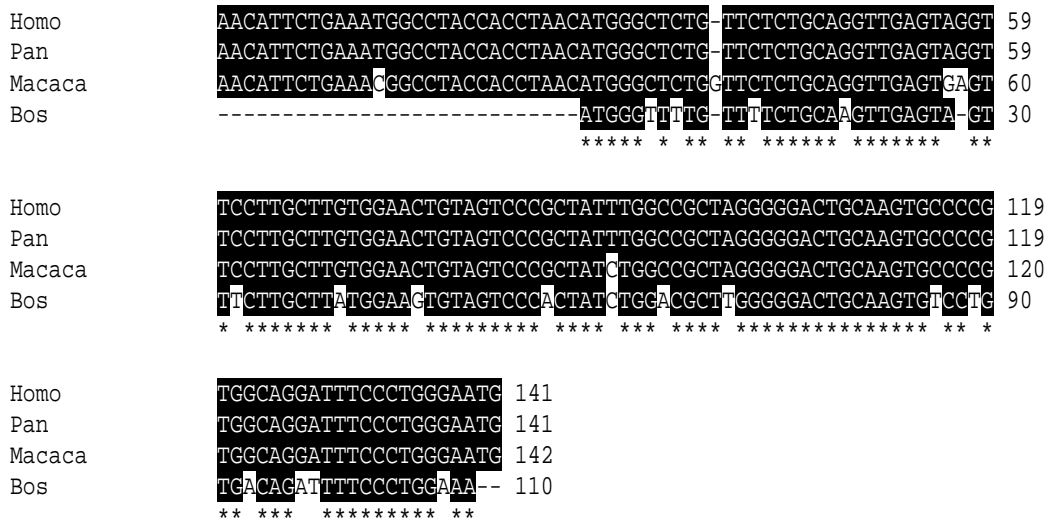
Les figures 46, 47 i 48 recullen les comparacions filogenètiques entre les diferents espècies dels exons 1C, 1D i 1E, respectivament.

A l'analitzar les seqüències intròniques vam comprovar que en la majoria d'espècies la conservació era inferior a la dels exons (taula 17). En primats (*Pan troglodytes* i *Macaca mulatta*), però, es mantenia una similitud de més del 93% en tots els introns, al ser comparats amb les seqüències humanes. El brau mantenia una homologia força alta, al voltant del 70%; tot i que en l'intró situat entre els exons 1C i 1B la semblança entre espècies sigui del 63%, cal esmentar que una part de la seqüència del brau contenia nucleòtids (N) no identificats. El ratolí mantenia semblança intrònica mitjana – alta en tots els introns excepte en el situat entre l'exó 1A i l'1E (taula 17).

En el grup dels no mamífers, totes tres espècies presenten similitud entre el 70% i el 80% en els introns situats entre els exons 1D i 1C i entre els exons 1C i 1B; en la comparació d'aquest últim exó, en totes tres espècies, faltaven una part dels nucleòtids que formen la seqüència intrònica (taula 17). La mosca de la fruita tampoc presenta similitud amb els introns humans (taula 17).

Taula 17. Comparació filogenètica dels introns d'AR humà

VERTEBRATS		INTRONS			
Mamífers	ESPÈCIE	1A/1E	1E/1D	1D/1C	1C/1B
	<i>Homo sapiens</i>	100%	100%	100%	100%
	<i>Pan troglodytes</i>	98%	98%	96%	97%
	<i>Macaca mulatta</i>	93%	95%	95%	90%
	<i>Bos taurus</i>	77%	79%	67%	63%
	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	0%	0%	0%	0%
	<i>Mus musculus</i>	0%	68%	88%	52%
No mamífers	ESPÈCIE				
	<i>Gallus gallus</i>	0%	0%	82%	74%
	<i>Xenopus laevis</i>	0%	0%	85%	79%
	<i>Danio rerio</i>	0%	0%	85%	72%
INVERTEBRATS	ESPÈCIE				
	<i>Drosophila melanogaster</i>	0	0	0	0



**Figura 46.** Comparació filogenètica de l'exó 1C. S'han marcat en negre els nucleòtids coincidents en les diferents espècies. Els números de la dreta corresponen al nombre de nucleòtids de la seqüència.

```

Homo      ATTA AAAATTATTCCTCACC GCAGTTGTTGAGCTTCTTGGAGACCATGCTGAAGATTTTC 60
Pan       ATTA AAAATTATTCCTCACC GCAGTTGTTGAGCTTCTTGGAGACCATGCTGAAGATTTTC 60
Macaca    ATTA AAAATTATTCCTCACC GCAATTGTTGAGCTTCTTGGAGACCATGCTGAAGATTTTC 60
Bos       -----AA CATTTC----- 8
                ** *****

Homo      TCCCCAGCAAATTAAGATATTAGTTTATCTGC-TGAGGGAGGACAGACTGAATTGGGGA 119
Pan       TCCCCAGCAAATTAAGATATTAGTTTATCTGC-TGAGGGAGGACAGACTGAATTGGGGA 119
Macaca    TCCCCAGCAAATTAAGATATTAGTTTATCTAG-TGAGGGAGGACATTA CTGAATTGGGGA 119
Bos       TTCC TGAGCAAATTAAGATATTAGTTTATCTCTGTGAGGGAGGGAATATT-AACTGGGGA 67
                * ** ***** ** * * * * *

Homo      ATTA ACTCCTCAG----- 132
Pan       ATTA ACTCCTCAGGTAGGCC 139
Macaca    ATT CACTCCTCAG----- 132
Bos       ACTA ACTCCTCAG----- 80
                * * * * *

```

**Figura 47.** Comparació filogenètica de l'exó 1D. S'han marcat en negre els nucleòtids coincidents en les diferents espècies. Els números de la dreta corresponen al nombre de nucleòtids de la seqüència.

```

Homo      GCAGATTAGAGTCAAAAAGACCGGCCCAATAGCTTCTCAGCGGGTATCCTCCAGAGAGGT 60
Pan       GCAGATTAGAGTCAAAAAGACCGGCCCAAGAGCTTCTCAGCGGGTATCCTCCAGAGAGGT 60
Macaca    GCAGATTAGAGTCAAAAAGACTGGCCCAAGAGCTTCTCAGCGGATCTCCTCCAAAGAGGT 60
Bos       GCAGCTTAGAGGCAAAAATGACTGGCCCAAGCTTTCTCAACCCGCTCCCAAGAGAT 60
                **** ***** * * * * *

Homo      AAAGTGAAATTTCTCGGTTAGGGAAGAAAGTGGTCTCTGGGTGCTGAGGTCTGCTGTGTG 120
Pan       AAAGTGAAATTTCTCGGTTAGGGAAGAAAGTGGTCTCTGGGTGCTGAGGTCTGCTGTGTG 120
Macaca    AAAATGAAATTTCTCGGTTAGGGAAGAAAGTGGTCTCTGGGTGCTGAGGTCTGCTATGTG 120
Bos       GAAAGGAA GCATGGGATTATGGGAAGAAAGTGGTCTCTGGGTGCTGAGGGCCCGCTGTATG 120
                ** ** * * * * *

Homo      AAAGG-----GTGAACTTCTTTCTCCTGAAGCAACTGGGGACTTGCTCCAGGGCTGGAG 174
Pan       AAAGG-----GTGAACTTCTTTCCCTGAAGCAACTGGGGACTTGCTCCAGGGCTGGAG 174
Macaca    AAGGA-----GTGAACTTCTTTCCCGGAAGCAACTGGGGACTTGCTCCAGGGCTGGAG 173
Bos       GGAAGATGAA GTGAACTTCCCTTTGCTGCAACAAG-GAGGACTTGCCCCAGGGTTGGAG 178
                ***** * * * * *

```

**Figura 48.** Comparació filogenètica de l'exó 1E. S'han marcat en negre els nucleòtids coincidents en les diferents espècies. Els números de la dreta corresponen al nombre de nucleòtids de la seqüència.

#### **4.1.6 Identificació de les unitats de transcripció d'AR en línies prostàtiques, no prostàtiques i teixits mitjançant PCR semiquantitativa**

Un cop identificades les noves isoformes de l'AR per 5'RLM-RACE es va voler comprovar quines línies cel·lulars i quins teixits expressaven aquestes isoformes. Mitjançant la PCR sq es van analitzar les línies prostàtiques LNCaP, PC3, DU145, PZ-HPV i MDA PCa2b, i les no prostàtiques OV90 (línia d'ovari), les línies de càncer de mama MDA 468, BT474 i T47D, HeLa, HepG2 (carcinoma hepàtic), CW9019 i RH30 (dues línies cel·lulars de rhabdomiosarcoma) i les Hek293. A més a més es va amplificar el cDNA de diferents controls positius (testicle, múscul fetal, cervell, ronyó, placenta, fetge fetal i fetge adult).

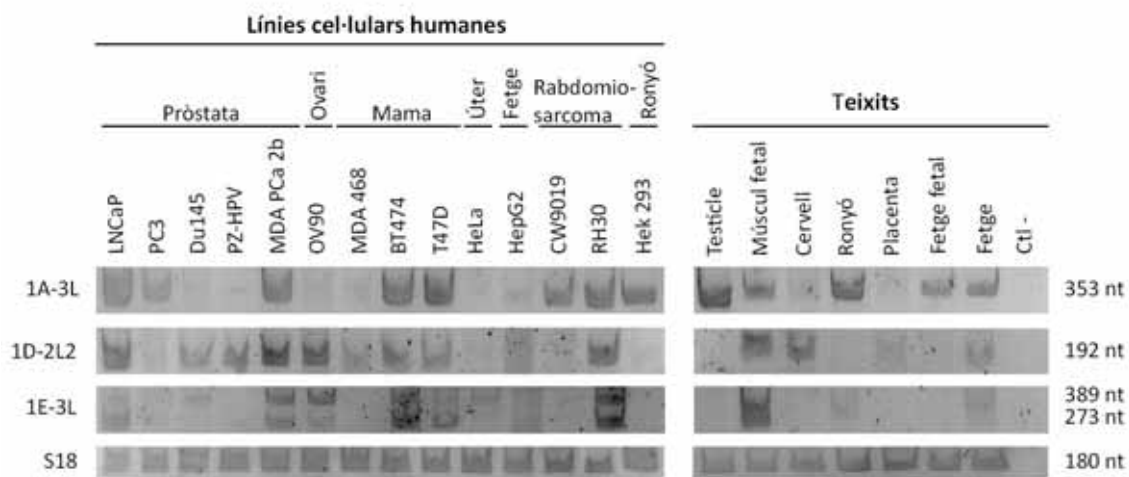
Al fer l'amplificació per la isoforma 1A per a les línies cel·lulars de càncer de pròstata, utilitzant un encebador sentit específic d'aquesta i un antisentit de l'exó 3, vam observar clarament expressió positiva en les LNCaP i les MDA PCa 2b. En les DU145 i les PZ-HPV no vam observar amplificació de la banda o una amplificació molt lleugera, respectivament. En les PC3 vam observar també expressió de la isoforma 1A, menys intensa que el LNCaP i MDA PCa 2b (figura 49).

La línia de càncer d'ovari OV90 i la línia de càncer de mama MDA468 gairebé no mostraven expressió d'AR 1A, mentre que les altres dues línies de càncer de mama (BT474 i T47D) presentaven una expressió d'AR 1A similar a la que presenten les LNCaP. Les HepG2 presentaven una expressió mínima. Les dues línies de rhabdomiosarcoma eren clarament positives per l'expressió d'AR 1A, així com també ho era la línia Hek293. En els teixits vam veure que expressaven clarament la isoforma 1A el testicle, el múscul fetal, el ronyó, el fetge fetal i el fetge adult. El cervell expressava nivells molt baixos i la placenta no l'expressava (figura 49).

A l'observar la isoforma 1D vam veure que hi era present en totes les línies cel·lulars de càncer de pròstata, amb el màxim d'expressió en les LNCaP i MDA PCa 2b; aquesta expressió disminuïa en les PZ-HPV i les DU145 i era mínima en les PC3. Les OV90 expressaven la isoforma 1D amb més intensitat que no pas les tres línies de càncer de mama, on l'expressió era menor. En HepG2, CW9019 i Hek293 era nul·la, mentre que en RH30 era molt positiva. A l'analitzar els teixits vam observar que el testicle, el ronyó i el fetge fetal no expressaven la

isoforma 1D d'AR, mentre que el múscul fetal, el cervell, el fetge i la placenta sí l'expressaven, sent aquest últim teixit el que menys l'expressava (figura 49).

L'expressió de la isoforma 1E la podíem observar en la línia LNCaP i MDA PCa 2b, obtenint dues bandes per a cada una de les línies. Totes dues bandes eren específiques i corresponien a la isoforma 1E que, en aquestes dues línies, presentava una subisoforma deguda a un lloc de *splicing* intern en aquest exó 1E. De la resta de línies de càncer de pròstata, només les DU145 expressaven 1E. En les OV90 vam trobar expressió positiva de totes dues subisoformes d'1E. En les línies de càncer de mama no teníem expressió d'1E en les MDA 468 però sí en les BT474 i les T47D (dues bandes a totes dues línies). En les línies de rabdomiosarcoma teníem expressió només en la línia RH30. Les Hek293 no expressaven AR 1E. En els teixits vam veure positivitat en el múscul fetal, en el ronyó (menys expressió que en múscul fetal) i en fetge. La resta de teixits no expressaven l'AR 1E (figura 49).

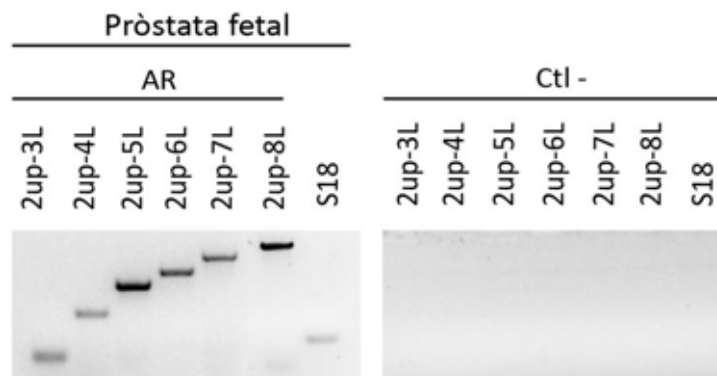


**Figura 49.** Anàlisi de l'expressió de les diferents unitats de transcripció d'AR mitjançant PCR sq. S'ha fet RT-PCR utilitzant cDNA de les diferents línies cel·lulars i teixits. El gen ribosomal S18 s'ha utilitzat com a gen normalitzador de l'expressió.

Es va analitzar també l'expressió de les diferents isoformes en el teixit prostàtic, utilitzant la línia LNCaP com a control positiu de l'amplificació. Abans de comprovar que la pròstata fetal expressava els diferents trànscrips d'AR es va comprovar que expressava AR utilitzant un encebador sentit que reconeixia la part comuna de tots els trànscrips aparellat amb un

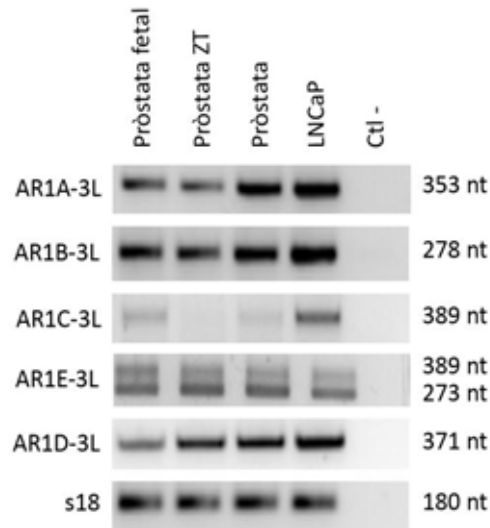


encebador antisentit per a cada exó de l'AR (exó 3, 4, 5, 6, 7 i 8). Com es pot observar a la figura 50, la pròstata fetal expressava el transcrit complet d'AR.



**Figura 50.** Anàlisi de l'expressió de l'AR mitjançant PCR sq, on s'ha utilitzat cDNA de la pròstata fetal. El gen ribosomal S18 s'ha utilitzat per a comprovar la integritat del RNA.

A l'analitzar tots els teixits prostàtics, per a la isoforma 1A i 1B vam observar producte d'amplificació de la PCR en la pròstata fetal, en la zona de transició d'una mostra de pròstata d'adult (pròstata ZT) així com també en la pròstata. En canvi, a l'analitzar els resultats obtinguts en l'amplificació de la isoforma 1C vam veure que la zona de transició de la pròstata no expressava 1C, mentre que la pròstata fetal i la pròstata sí l'expressaven, però les bandes en aquests teixits eren menys intenses que en la línia cel·lular LNCaP. A l'analitzar 1E vam observar com en tots els teixits prostàtics passava el mateix que en les LNCaP, amplificàvem dues bandes, una de 397 nucleòtids que corresponia a l'exó 1E identificat en el 5' RLM RACE i una altra de 300 nucleòtids que corresponia a una part d'aquest exó. La isoforma 1D s'expressava també en tots els teixits prostàtics, sent la seva expressió lleugerament inferior en la pròstata fetal (figura 51).



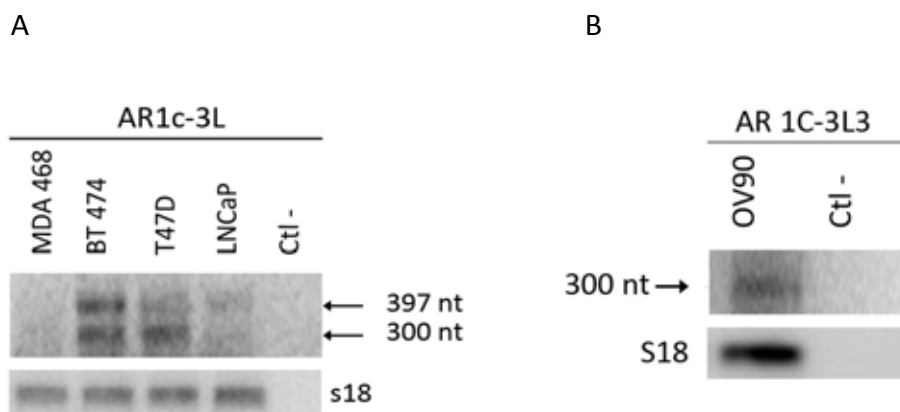
**Figura 51.** Expressió de les diferents unitats de transcripció d'AR mitjançant PCR sq en diferents teixits prostàtics i la línia cel·lular LNCaP. El gen ribosomal S18 s'ha utilitzat per a normalitzar la quantitat de RNA.

Els resultats obtinguts per a la isoforma 1C es van tractar de manera diferent ja que, tot i intentar-ho amb diferents teixits, diferents polimerases i diferents condicions d'amplificació no es va aconseguir obtenir tota la seqüència de mRNA, és a dir, no es va poder amplificar el mRNA des de l'exó 1 fins al 8, com sí s'havia aconseguit amb 1D i 1E.

Així doncs, un cop identificat l'exó 1C mitjançant 5'RLM RACE, comprovat que els *splice sites* presentaven les seqüències consens correctes i que l'exó 1C enllaçava amb l'exó 2 i després amb el 3, i identificada la posició en el DNA genòmic es va procedir a l'amplificació del mRNA d'aquesta isoforma en diferents línies i teixits.

Primerament es va voler comprovar si en les línies de mama MDA468, BT474 i T47D hi havia expressió a nivell de mRNA per a la isoforma 1C. En la línia MDA468 no s'observà cap banda en l'amplificació del cDNA per PCR sq. En canvi, en les altres dues línies de mama s'observà una doble banda, una de 300 nt i l'altra de 397 (figura 52A). Aquestes dues bandes es van retallar, clonar i seqüenciar, i a l'analitzar-les no es va obtenir cap seqüència corresponent a l'AR. En aquesta mateixa amplificació es va utilitzar cDNA de la línia de càncer de pròstata LNCaP com a control positiu de l'expressió d'1C. En aquets cas vam veure l'amplificació d'una única banda de 397 nt de tamany, però de molt menys intensitat que en les línies de càncer de mama.

Es va utilitzar també la línia de càncer d'ovari OV90 per intentar obtenir el transcrit complet d'AR 1C. Es va començar utilitzant un encebador sentit per a l'exó 1C i un antisentit contra l'exó 3 (figura 52B). La banda obtinguda es va retallar i seqüenciar, i es va obtenir que sí era l'exó 1C unit a l'exó 2 i al 3. Quan es va provar de fer amb un encebador antisentit contra l'exó 8 no es va obtenir cap banda, ni per les OV90 ni per les LNCaP (no es mostren els resultats). Així doncs, com que en les línies cel·lulars no s'havia aconseguit l'amplificació, es va procedir a mirar si en teixits s'expressava.

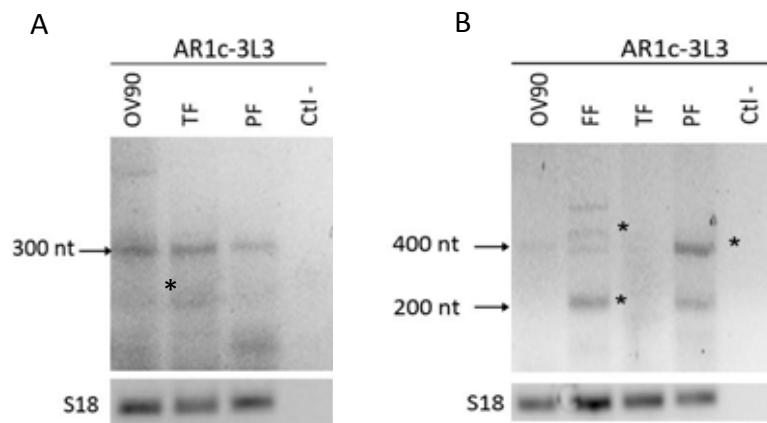


**Figura 52.** Anàlisi de l'expressió de la isoforma 1C en diferents línies cel·lulars mitjançant PCR sq. **A)** Amplificació de les línies de càncer de mama MDA 468, BT474 i T47D utilitzant un encebador sentit específic d'1C i un antisentit localitzat a l'exó 3 d'AR. Les LNCaP es van utilitzar com a control positiu de la reacció. **B)** Amplificació de la línia de càncer d'ovari OV90. El gen ribosomal S18 s'ha utilitzat per a normalitzar de la quantitat de RNA.

Primerament es va amplificar el cDNA de la línia OV90 com a control positiu de la reacció juntament amb cDNA de testicle fetal (TF) i pròstata fetal (PF). En la figura 53 podem observar com tant la línia cel·lular com tots dos teixits fetals presentaven una banda de 300 nt (corresponent a la mida de l'amplicó) i apareixien també altres bandes inespecífiques i de mida inferior que no es van tenir en compte. A més, en les OV90 semblava que hi hagués una banda superior, que per altres amplificacions i seqüenciacions anteriors sabíem que era inespecífica. Per tal d'intentar eliminar aquestes bandes inespecífiques i augmentar la rendibilitat de la reacció de PCR sq es va repetir l'amplificació, però a una temperatura d'anellament de 60 °C enlloc dels 58°C de l'anterior amplificació. A més si hi va afegir un altre teixit, el fetge fetal (FF). Com a resultat d'aquesta amplificació vam observar que no hi havia cap banda amplificada a 300 nt ni per a les OV90 ni per cap dels teixits fetals. Apareixia, però, una banda de 200 nt al fetge fetal i a la pròstata fetal (figura 53B). Aquesta

banda es va retallar, clonar i seqüenciar, però en l'anàlisi de la seqüència va resultar ser inespecífica. El mateix va passar amb la banda de 400 nt que apareixia en el gel a la pròstata fetal amb molta més intensitat que en les OV90. En el fetge fetal, en canvi, apareixien tres bandes, al voltant dels 400 nt, de menor intensitat que la banda de 400 nt de la pròstata fetal. Es van retallar totes tres bandes, es van clonar i seqüenciar, obtenint com a resultat la inespecificitat de bandes. (Les bandes que es van retallar apareixen marcades amb un asterisc en la imatge de la PCR).

També es va provar d'amplificar el transcrit complet en els teixits, obtenint o bé bandes inespecífiques o cap banda (no es mostren els resultats).

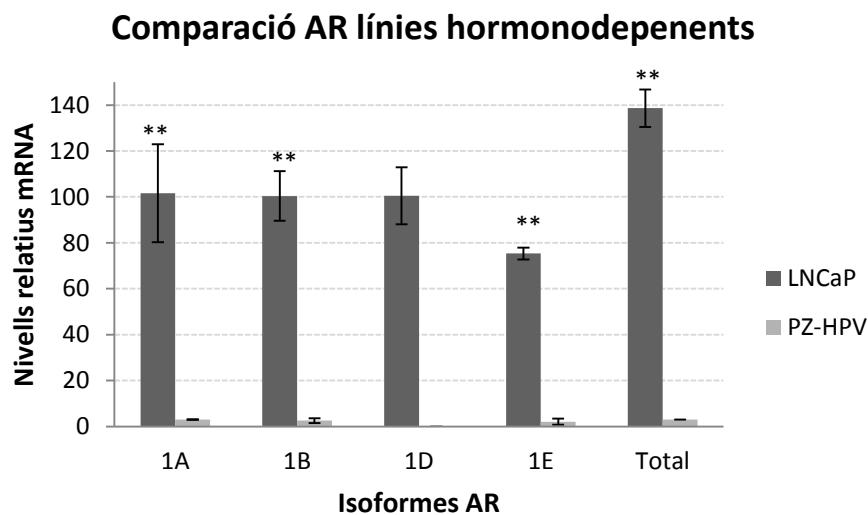


**Figura 53.** Anàlisi de l'expressió de la isoforma 1C en la línia cel·lular OV90 i en teixits mitjançant PCR sq. **A)** Amplificació de la línia de càncer d'ovari OV90, testicle fetal (TF) i pròstata fetal (PF) utilitzant un encebador sentit específic per 1C i un antisentit situat a l'exó 3. **B)** Amplificació de la línia de càncer d'ovari OV90, de fetge fetal (FF), de testicle fetal (TF) i de pròstata fetal (PF) amb els mateixos encebadors que en A. Les bandes marcades amb asterisc es van retallar, clonar i seqüenciar.

#### 4.1.7 Anàlisi de l'expressió de les isoformes d'AR en les línies cel·lulars de càncer de pròstata mitjançant PCR quantitativa

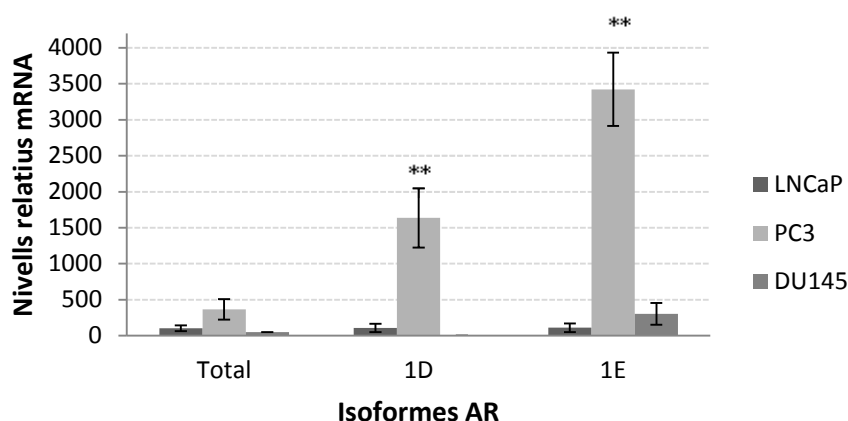
Vam analitzar els nivells de mRNA de les isoformes d'AR en les línies de càncer de pròstata hormonodepenents i hormonoindependents. En l'anàlisi de les primeres es van comparar els nivells entre les LNCaP i les PZ-HPV, considerant els nivells de les LNCaP com al 100%. Vam observar que les PZ-HPV presentaven nivells relatius de mRNA molt baixos en comparació

amb la línia LNCaP, tant de totes les isoformes d'AR com de l'AR total, tot i ser una línia hormonodependent i positiva per l'AR (figura 54). En el cas de les línies hormonoindepenents PC3 i DU145, negatives per les isoformes 1A i 1B, tant a la literatura com per PCR sq, es van analitzar només les isoformes 1D i 1E, juntament amb l'AR total (figura 55). Així doncs, les PC3 presentaven uns nivells de mRNA d'AR totals superiors als de les LNCaP, sent encara més superiors i significatius estadísticament els nivells de mRNA de la isoforma 1D i 1E. En el cas de les DU145, els nivells de mRNA de l'AR total eren inferiors als de les LNCaP, els nivells de la isoforma 1D eren indetectables, mentre que la isoforma 1E presentava nivells de mRNA superiors als de les LNCaP, tot i no tenir significació estadística (figura 55).



**Figura 54.** Nivells relatius de mRNA d'AR i les seves isoformes en línies cel·lulars hormonodepenents. Mitjançant PCR quantitativa a temps real es van quantificar els nivells de mRNA de les isoformes d'AR i la quantitat d'AR total en les LNCaP i les PZ-HPV. El gen ribosomal S18 humà s'ha utilitzat com a normalitzador en l'amplificació. \* $p < 0,05$  i \*\* $p < 0,01$  considerant els nivells d'expressió de les LNCaP com a 100%.

### LNCaP vs línies hormonoindependents



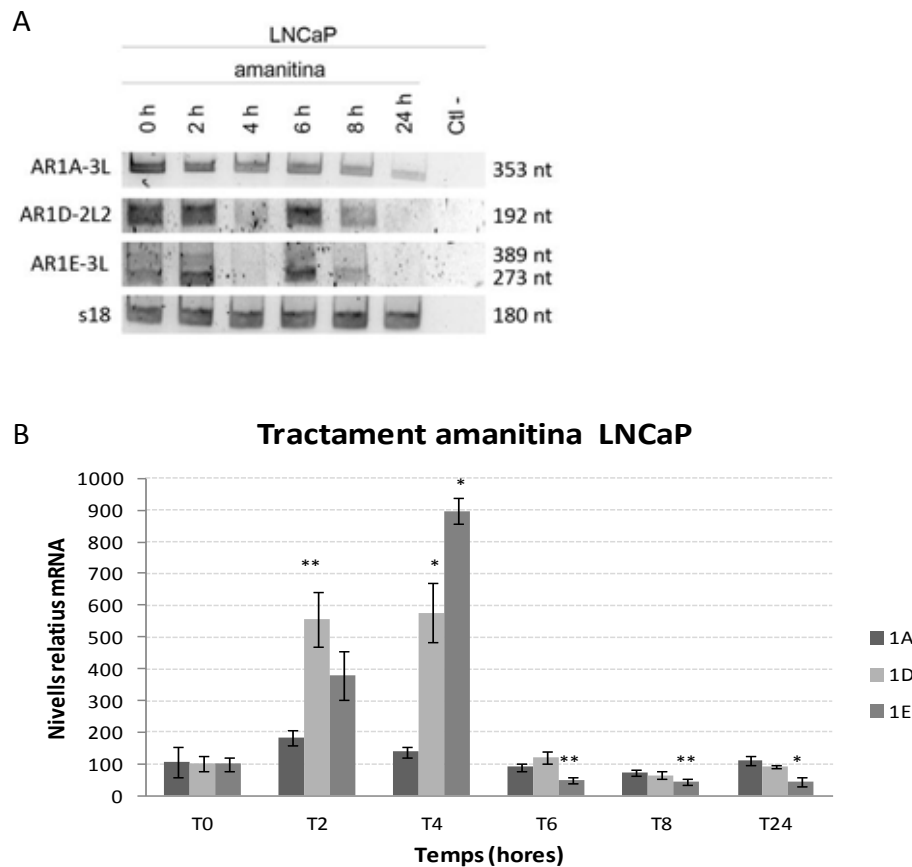
**Figura 55.** Nivells relatiu de mRNA d'AR i les seves isoformes en línies cel·lulars hormonoindependents. Mitjançant PCR quantitativa a temps real es van quantificar els nivells de mRNA de les isoformes 1D i 1E d'AR i la quantitat d'AR total en les LNCaP, PC3 i DU145. El gen ribosomal S18 humà s'ha utilitzat com a normalitzador en l'amplificació. La barra indica la desviació estàndard corresponent a 3 experiments independents. \* $p < 0,05$  i \*\* $p < 0,01$  considerant els nivells d'expressió de les LNCaP com a 100%.

#### 4.1.8 Anàlisi de l'estabilitat del RNA de les isoformes d'AR

Per intentar saber la vida mitjana de les noves isoformes, en presència d'andrògens, vam tractar les LNCaP amb amanitina durant 2, 4, 6, 8 i 24 hores i vam analitzar mitjançant PCR sq l'expressió de les isoformes. Tal i com es pot observar a la imatge (figura 56A), per a la isoforma 1A vam observar una banda intensa durant el temps 0, 2, 4, 6, i 8 hores, mentre que a les 24 hores semblava una banda menys intensa. En les isoformes 1D i 1E vam observar un comportament similar entre elles però diferent respecte de la isoforma 1A. En el cas de 1D i 1E vam detectar la presència de cada una de les isoformes a les 0 i 2 hores, mentre que a les 4 hores desapareixia o gairebé, fet que ens va fer pensar que presentaven poca vida mitjana i, per tant, no eren estables. En canvi, vam observar que a temps 6 hores tornava a apreciar-se una banda de bastant intensitat, la qual anava disminuint d'intensitat a les 8 hores i finalment desapareixia a les 24 hores (figura 56A).

Mitjançant la PCR a temps real es va voler quantificar quant transcrit hi havia de cada una de les isoformes. Es va considerar el temps 0 hores (no tractament) com a 100% de l'expressió de cada una de les isoformes d'AR. En contraposició als resultats de la PCR sq, en la

quantificació vam observar que en el temps 2 hores de tractament tant la isoforma 1D com 1E havien augmentat la seva expressió respecte de la seva expressió al temps 0. El mateix fenomen s'observava a les 4 hores de tractament, totalment en contradicció amb la PCR sq, on en aquest temps desapareixia la banda de totes dues isoformes. En el temps 6, 8 i 24 hores de tractament semblava que, mentre la isoforma 1D mantenia els seus nivells de mRNA, la isoforma 1E els anava disminuint. Si observàvem la isoforma 1A, també augmentava els seus nivells en el temps 2 i 4 hores, mentre que en el temps 6, 8 i 24 hores es mantenia la quantitat de mRNA d'aquesta isoforma. El fet que a totes 3 isoformes els hi passés el mateix ens va fer pensar en un possible error en la tècnica o en el tractament de les cèl·lules (figura 56B).

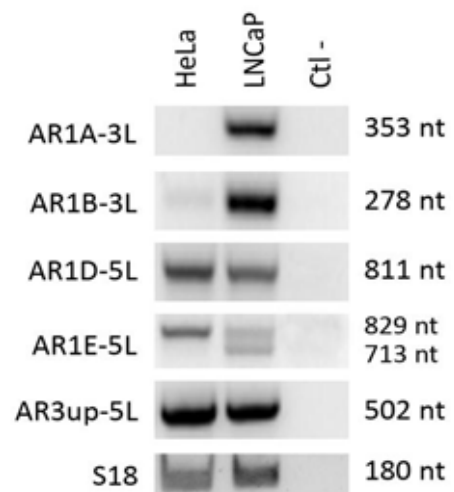


**Figura 56.** Nivells de mRNA de les isoformes 1A, 1D i 1E d'AR en la línia cel·lular LNCaP quantificats mitjançant PCR sq en **A** i mitjançant PCR quantitativa a temps real en **B**. Es van tractar les LNCaP amb  $\alpha$ -amanitina a diferents temps: abans del tractament (T0), 2 (T2), 4 (T4), 6 (T6), 8 (T8) i 24 (T24) hores després de l'inici del tractament. El gen ribosomal S18 humà s'ha utilitzat com a gen normalitzador de l'expressió. \* $p < 0,05$  i \*\* $p < 0,01$  considerant els nivells d'expressió de les LNCaP a T0.

#### 4.1.9 Estudis de la traducció de les isoformes d'AR

Després d'analitzar els exons 1C, 1D i 1E vam comprovar que no hi havia un codó d'inici de la traducció en pauta, per tant, aquests exons (juntament amb l'exó 2 i part de l'exó 3) estaven actuant com a seqüències UTR (*untranslated regions*) i possiblement modulant la traducció que s'iniciaria a partir de l'ATG en pauta de l'exó 3. Per a comprovar com la seqüència 5'UTR podia modular la traducció de la seva isoforma corresponent es va calcular el percentatge de GC que hi havia per a les seqüències 5'UTR de cada transcrit i, mitjançant el programa MFOLD es van analitzar les estructures secundàries de les seqüències 5'UTR de les 5 isoformes d'AR (figures 38, 39, 40, 42 i 43). En analitzar les estructures secundàries predites pel programa i comparar-les entre elles vam observar com l'estructura predita per a l'exó 1A era la més complexa amb una  $\Delta G$  de -359.83 kcal/mol, i curiosament, la menys complexa era la predita per l'exó 1B, amb una  $\Delta G$  de -44.90 kcal/mol. Les estructures secundàries corresponents als tres nous exons alternatius descrits al laboratori presentaven una complexitat intermitja entre els transcrits del 5'UTR que s'inicien amb l'exó 1A i els que s'inicien amb l'exó 1B. Així doncs, l'estructura secundària més estable era la del 5'UTR del transcrit que s'inicia amb l'exó 1E amb una  $\Delta G$  de -121.7 kcal/mol, seguida de la que s'inicia amb l'exó 1C ( $\Delta G = -121.20$  kcal/mol) i finalment, la menys complexa seria l'estructura del 5'UTR que s'inicia amb l'exó 1D, amb una  $\Delta G$  de -105.04 kcal/mol. Amb aquestes prediccions de les estructures secundàries dels 5'UTR vam decidir comprovar si realment hi havia traducció.

Abans de començar amb el disseny de les diferents construccions, vam corroborar la manca d'expressió de la isoforma 1A d'AR en la línia cel·lular HeLa, mitjançant PCR sq. Quan s'utilitzaren encebadors per a la regió comuna d'AR s'observà l'expressió d'aquest en les línies cel·lulars HeLa i LNCaP (figura 57). En canvi, quan s'utilitzaren encebadors específics per a cada isoforma s'observà una expressió clara dels primers exons 1D i 1E en totes dues línies, una expressió clara de l'exó 1B en la línia cel·lular LNCaP i feble en HeLa. Finalment vam



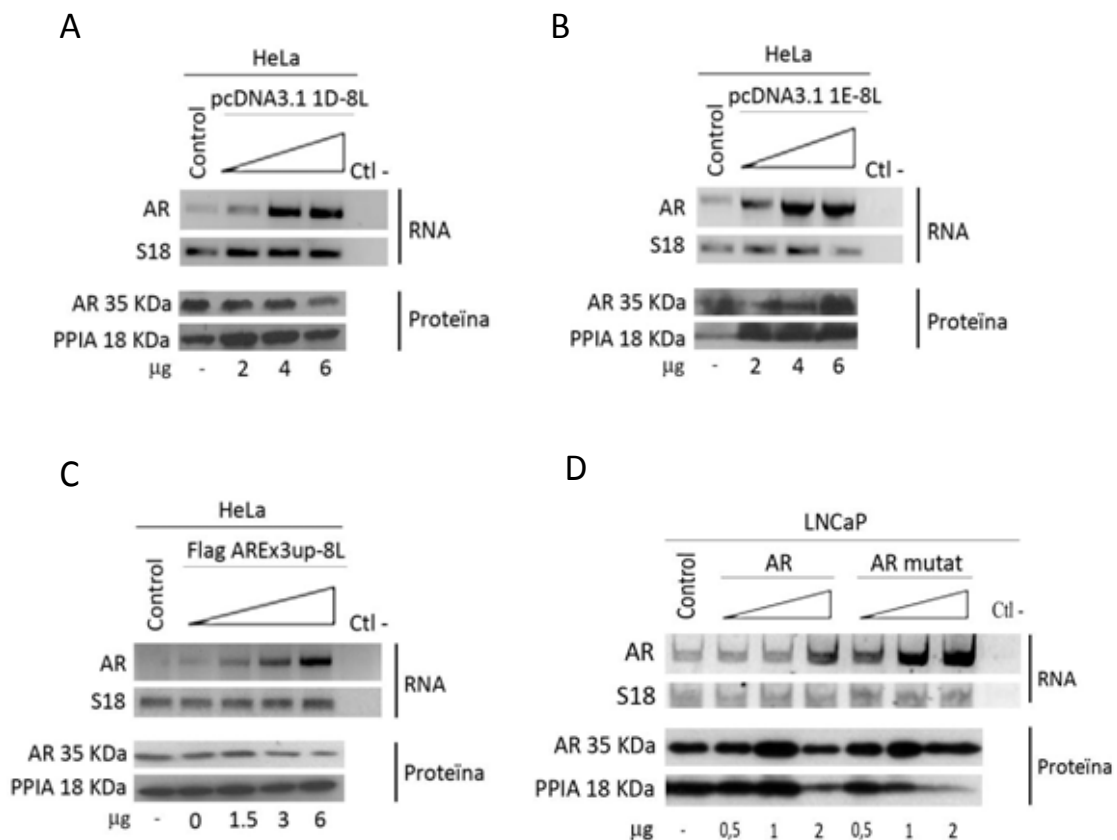
**Figura 57.** Anàlisi de l'expressió de les isoformes d'AR en les línies cel·lulars HeLa i LNCaP.



comprovar que la línia cel·lular HeLa no expressava l'exó 1A, mentre que les LNCaP sí l'expressaven (figura 57).

Un cop ja comprovada l'expressió dels diferents exons alternatius d'AR en la línia cel·lular HeLa es va procedir a investigar la capacitat de traducció de cada una d'aquestes isoformes. Per a fer-ho es van dissenyar dos tipus d'experiments independents. Per al primer, es van realitzar diverses construccions amb diferents vectors per a les isoformes 1D i 1E. Primerament es van realitzar construccions per AR 1D i per 1E amb el vector pcDNA3.1 i es van transfectar a la línia cel·lular HeLa, que no expressa AR1A. Cada constructe (pcDNA3.1 1D-8L i pcDNA3.1 1E-8L) es va afegir al cultiu cel·lular a concentracions creixents (2, 4 i 6 µg). Es va obtenir el mRNA i la proteïna d'aquests cultius transfectats amb els constructes per 1D (figura 58A) i 1E (figura 58B), així com també de cèl·lules no transfectades. El mRNA es van utilitzar per comprovar que la transfecció havia anat correctament, i la proteïna per intentar determinar si la banda detectada a 35 KDa amb l'anticòs anti ARC-19 reconeixia realment les isoformes. Els resultats obtinguts amb la proteïna no eren massa aclaridors, ja que no es veia augment de la intensitat de la banda al comparar-la amb la banda de les condicions control (figura 58A i B), per això es va optar per utilitzar una segona construcció. Aquesta es va fer amb el vector Flag, amb promotor d'expressió constitutiva i la seqüència de mRNA codificant i comuna per a les isoformes 1D i 1E, és a dir, sense l'extrem 5'UTR; es va anomenar la construcció Flag AREx3-8L. Es va transfectar la línia cel·lular HeLa amb concentracions creixents del constructe (1.5, 3 i 6 µg) i es va recollir també el mRNA i la proteïna. Es va comprovar a nivell de mRNA que s'havia transfectat bé el cultiu (figura 58C), però a l'analitzar els resultats del *western blot* no semblava que s'observés cap banda clarament en augment (figura 58C). Així doncs, per evitar possibles competències entre l'inici de traducció propi de l'AR amb el del Flag, es va realitzar una nova construcció mutant l'ATG en pauta de l'AR. Finalment teníem, doncs, dues construccions amb Flag, una amb l'ATG de l'AR mutat i l'altra no. Aquestes construccions es van transfectar en les LNCaP amb concentracions creixents de la construcció (0.5, 1 i 2 µg) i també es va obtenir mRNA i proteïna amb la mateixa finalitat que a les HeLa. A nivell de mRNA es pot comprovar com augmenta la intensitat de banda tant a la construcció amb el Flag mutat (AR mutat) com en la no mutada (AR) des dels 0.5 µg als 2 µg de construcció, respecte al control (figura 58D). Això ens indicà que la transfecció s'havia realitzat correctament amb totes dues construccions ja que teníem

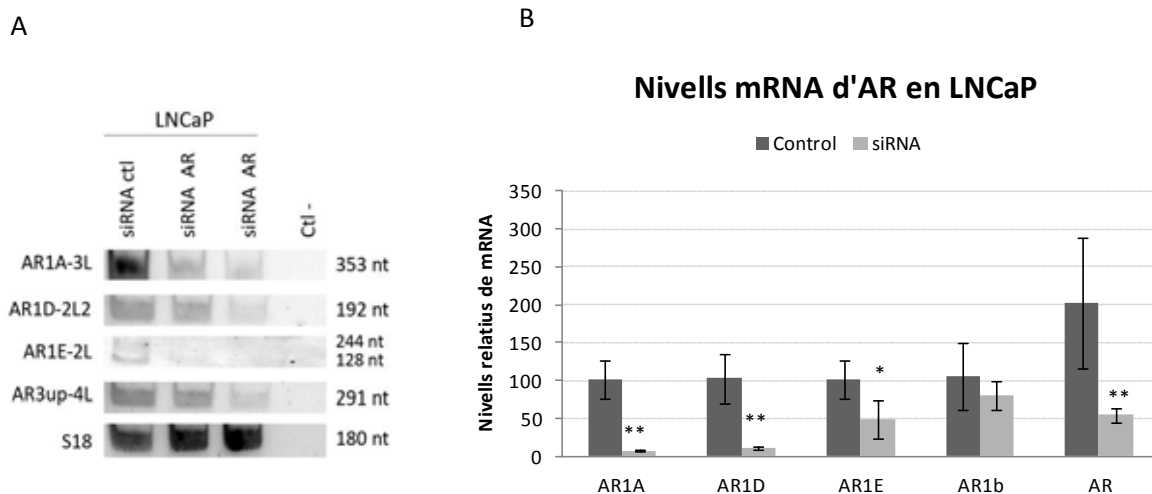
augment de mRNA. Per *western blot*, a l'analitzar la ratio entre AR/PPIA es va detectar un augment creixent i proporcional a la quantitat de constructe transfectat (figura 58D). La mida de la banda d'AR era de 35 KDa, i segons les prediccions *in silico*, corresponia a la mida de la proteïna codificada per les isoformes d'AR 1D, 1E i 1C. Per a la detecció del mRNA i de la proteïna es van utilitzar encebadors i anticossos que reconeixen, respectivament, l'AR total i el promotor de la construcció.



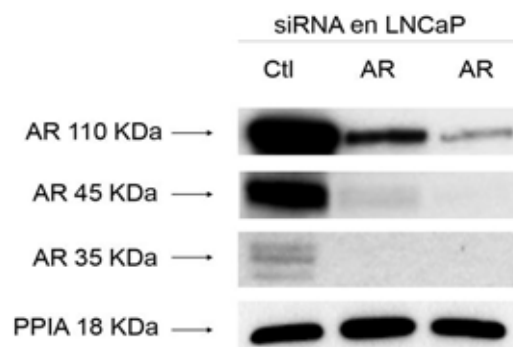
**Figura 58.** Anàlisi de les construccions d'AR. **A)** Nivells de RNA d'AR1D detectats mitjançant PCR sq, utilitzant un encebador sentit específic per al vector i un encebador antisentit que reconeixia l'exó 8 d'AR, i de proteïna, detectats amb l'anticòs C-19 d'AR en les HeLa transfectades amb 2, 4 i 6 µg de la construcció d'AR pcDNA3.1 1D – 8L. **B)** Nivells de RNA i de proteïna d'AR1E detectats amb les mateixes tècniques i condicions que en A, però havent transfectat 2, 4 i 6 µg del constructe d'AR pcDNA3.1 1E – 8L. **C)** Nivells de RNA i de proteïna detectats en les HeLa transfectades amb 1.5, 3 i 6 µg de la construcció d'AR FlagEx3up – 8L mitjançant RT-PCR i *western blot* (anti AR C19). Per a la PCR sq s'han utilitzat encebadors específics del vector flag i de l'exó 8 de l'AR. **D)** Nivells de RNA i de proteïna detectats per PCR sq i *western blot*, respectivament, en les LNCaP transfectades amb la construcció d'AR FlagEx3up – 8L (AR) i amb la construcció FlagEx3up – 8L amb l'ATG d'AR mutat (AR mutat). El gen ribosomal S18 humà s'ha utilitzat com a normalitzador en l'amplificació i el gen PPIA s'ha utilitzat per a normalitzar la càrrega en A, B, C i D.

En el segon experiment es va transfectar la línia LNCaP amb un siRNA d'AR comercial que reconeixia la part comuna del receptor. Mitjançant PCR sq i quantitativa a temps real es va verificar que l'experiment havia funcionat. En la PCR sq (figura 59A) es va apreciar una disminució del nivell de mRNA d'AR tant en l'amplificació de la part comuna d'AR com si s'utilitzaven encebadors específics per als primers exons alternatius, sempre comparant amb els nivells de mRNA d'AR del siRNA control (figura 59A). En la PCR quantitativa (figura 59B) es pot observar que disminueix també el nivell de mRNA de l'AR total com el mRNA de les isoformes, amb significació estadística, excepte el de la 1B, on hi ha una disminució, però no és estadísticament significativa. A l'analitzar la proteïna també es va observar la disminució d'intensitat de banda o la desaparició d'aquesta tant en la banda de 110 KDa (corresponent a la isoforma 1A), en la de 45 KDa (isoforma 1B) com en la banda de 35 KDa (banda que correspondria a les isoformes 1C, 1D i 1E) (figura 60).

Així doncs, tots dos experiments (les construccions i el siRNA) ens porten a pensar que les noves isoformes de l'AR trobades al grup es traduïrien i que som capaços de detectar-les amb l'anticòs anti AR C-19, amb un pes molecular al voltant del 35 kDa.



**Figura 59. A i B)** Nivells de mRNA d'AR detectats en les LNCaP transfectades amb el siRNA control i amb el siRNA d'AR (per duplicat) en la línia cel·lular LNCaP, seguint les indicacions del proveïdor, mitjançant PCR sq i PCR quantitativa a temps real, respectivament. El gen ribosomal S18 humà s'ha utilitzat com a normalitzador en l'amplificació.



**Figura 60.** Nivells de proteïna d'AR en les LNCaP transfectades en les mateixes condicions que en la figura 59. S'ha utilitzat l'anticòs anti AR C-19 per a detectar les tres mides de banda de proteïna codificats per les isoformes d'AR. El gen PPIA s'ha utilitzat com a normalitzar de la càrrega.

#### 4.1.10 Identificació de possibles nous exons alternatius en l'extrem 3' utilitzant la tècnica del 3' RLM-RACE

Per acabar de fer l'estudi de possibles exons alternatius que regulin l'expressió de l'AR es va fer un assaig de 3'RACE. Abans de realitzar-lo, i sabent que a la literatura ja estaven descrits 2 extrems 3'UTR diferents d'AR resultants de dues senyals de poliadenilació igualment efectives (ATTA AAA i CATA AAA; Faber et al., 1990), es va utilitzar el programa PolyApred per a predir nous possibles senyals de poliadenilació alternativa en la seqüència genòmica d'AR. El programa, però, no va identificar cap de les dues seqüències consens en mamífers. Un altre indicatiu que ens va induir a realitzar l'experiment del 3' RACE va ser que a l'analitzar l'intró 7 vam trobar dues possibles seqüències de poliadenilació (AAGAAA i AAAACA; figura 61)) alternatives a les consens, descrites en el treball de Beaudoin i col·laboradors l'any 2000 (Beaudoin, Freier et al. 2000).

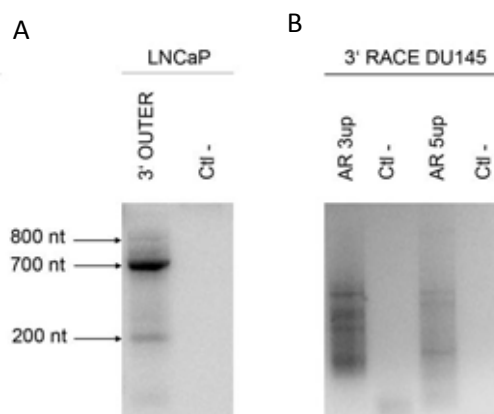
```

cgtgggcatg cttcccctcc ccattctgtc ttcattcccac atcagTTCCA 66859398
GTGGATGGGC TGAAAAATCA AAAATTCTTT GATGAACTTC GAATGAACTA 66859448
CATCAAGGAA CTCGATCGTA TCATTGCATG CAAAAGAAAA AATCCCACAT 66859498
CCTGCTCAAG ACGCTTCTAC CAGCTCACCA AGCTCCTGGA CTCCGTGCAG 66859548
CCTgtaagca aacgatggag ggtgctttat cagggagaac agcctgatag 66859598
agccaatgat aatatgcttc tctagagtct ggcaccacct gttgggaggt 66859648
gcttccattc ccctctggct ttgagtgtgg tccaggaaga aaatgtggtg 66859698
aagaaaagaa cacgggtcac agtgtcccag ctggatattg tgaaaggggt 66859748
ggaggagttg agaacagagc agttgggact caggggaaggg acttgcagca 66859798
gatgaattct ctaggcagac aaaacagacc tggatgtttt tcccctcttc 66859848

```

**Figura 61.** Seqüència genòmica de l'AR. L'exó 7 està representat amb els nucleòtids en majúscula. Els nucleòtids en minúscula pertanyen a l'intró 6 i l'intró 7. En l'intró 7 s'assenyalen amb gris els possibles llocs de poliadenilació (aagaaa i aaaaca). La numeració de la dreta fa referència a la posició dels nucleòtids en el cromosoma X (NC\_000023.10).

El 3'RACE es va realitzar amb les línies cel·lulars LNCaP i DU145. Per a totes dues línies es va realitzar una única ronda d'amplificació, utilitzant un encebador antisentit comú proporcionat pel *kit* combinat amb un encebador sentit específic per a l'exó 7 d'AR en el cas de les LNCaP, i encebadors sentit per a l'exó 3 i 5 en el cas de les DU145. En les LNCaP es van obtenir tres bandes clares, de les quals una de 700 nucleòtids era la més intensa (figura 62A). Es van retallar, clonar i seqüenciar totes 3, obtenint només una possible seqüència alternativa per a l'extrem 3' d'AR. A l'analitzar la seqüència es va comprovar que l'extrem 3' trobat corresponia a un dels dos ja descrits en l'AR per Faber i col·laboradors l'any 1990. En les DU145 es van retallar, clonar i seqüenciar les bandes obtingudes amb tots dos encebadors específics d'AR, però no es van obtenir possibles seqüències alternatives per a l'extrem 3' de l'AR (figura 62B).

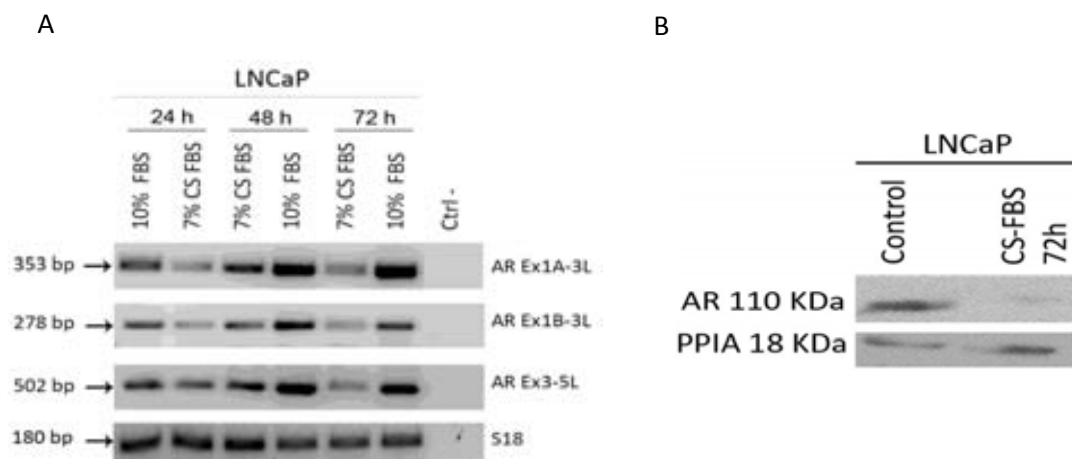


**Figura 62.** Amplificació, mitjançant PCR sq del cDNA obtingut al 3'RLM-RACE per a la identificació de bandes que corresponguin a possibles nous exons d'AR en l'extrem 3'. **A)** Amplificació del cDNA de les LNCaP, on es destaquen les 3 bandes que es van estudiar. **B)** Amplificació del cDNA de les DU145. Es van retallar totes les bandes en un únic bloc.

## 4.2 ANÀLISI DELS NIVELLS DE mRNA DE L'AR EN LA LÍNIA CEL·LULAR LNCaP EN CONDICIONS DE DEPRIVACIÓ HORMONAL

En el primer experiment es va deprivar d'hormones el sèrum fetal boví del medi cel·lular de creixement d'aquestes cèl·lules LNCaP (mitjançant el mètode estàndard del carbó actiu o *charcoal*) per simular el tractament de supressió hormonal que es realitza en el càncer de pròstata. Un cop obtingut el *pellet* de les cèl·lules crescudes durant 24, 48 i 72 hores amb i sense deprivació hormonal (7% CS-FBS i 10% FBS, respectivament) es va procedir a analitzar els nivells de mRNA de l'AR mitjançant PCR sq. Es van utilitzar encebadors específics per a les isoformes 1A i 1B, així com també encebadors que reconeixien la part comuna del mRNA d'AR (concretament de l'exó 2 al 5). A l'analitzar el mRNA de les LNCaP crescudes en condicions de deprivació hormonal (7% CS-FBS) vam observar com tant a les 24, 48 i 72 hores la intensitat de banda disminuïa. Aquesta disminució d'expressió d'AR en els tres períodes de temps s'observava tant per les isoformes 1A i 1B com per la part comuna de tots els trànscrips de l'AR, al ser comparada amb l'expressió de les isoformes 1A, 1B i la part comuna a totes les isoformes de les LNCaP crescudes al 10% FBS en els tres temps (figura 63A). A l'analitzar els nivells de proteïna de l'AR 1A (110 KDa) en les LNCaP crescudes en deprivació hormonal durant 72 hores es va observar una disminució de la quantitat de proteïna d'AR (figura 63B).

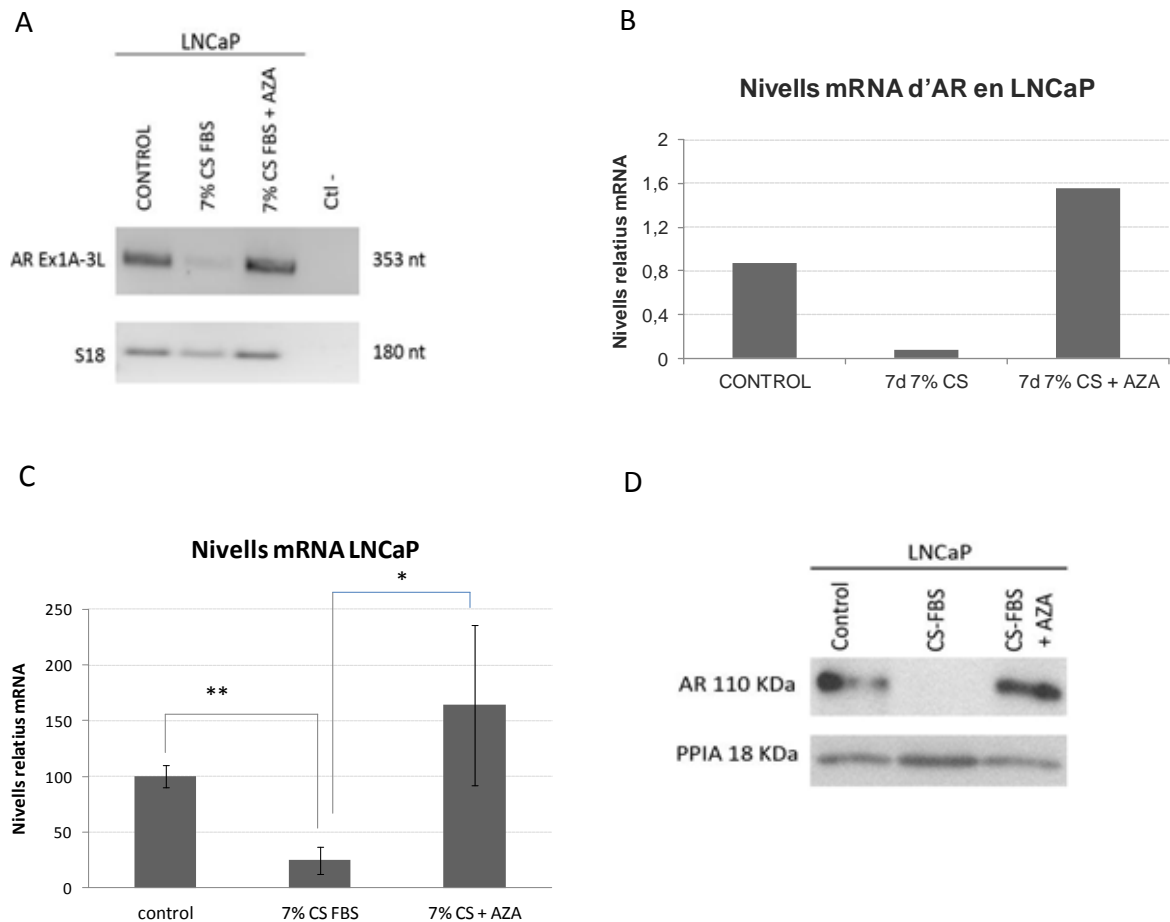
S'ha descrit que la deprivació hormonal provoca metilació del promotor dels gens, i per tant, el seu silenciament (Chuang et al., 2007). Per això vam voler tractar les cèl·lules amb un inhibidor de la metilació, la 5-aza-2-deoxicitidina (5-AZA), per veure si érem capaços de recuperar l'expressió de l'AR.



**Figura 63. A)** Detecció de l'expressió d'AR mitjançant PCR sq en LNCaP crescudes amb deprivació hormonal (7% CS-FBS) o sense (10% FBS) durant 24, 48 i 72 hores. El gen S18 s'ha utilitzat com a gen normalitzador de l'expressió. **B)** Detecció dels nivells de proteïna d'AR, mitjançant *western blot*, en les LNCaP crescudes amb deprivació d'hormona (CS-FBS) i sense (control) durant 72 hores. El gen PPIA s'ha utilitzat com a normalitzador de la càrrega.

En experiments previs fets en el grup havíem comprovat que la màxima disminució en l'expressió d'AR sense que les cèl·lules presentessin cap canvi morfològic ni aturada en el cicle cel·lular era a les 72 hores. Per aquest motiu vam cultivar les cèl·lules LNCaP durant aquest període de temps amb deprivació hormonal, en presència o absència de l'agent inhibidor de la metilació (5-AZA). A l'analitzar els resultats de la PCR sq vam observar que, com ja havíem vist abans, en condicions de deprivació hormonal (7% CS-FBS) els nivells de mRNA de la isoforma 1A d'AR disminuïen comparats amb els nivells de mRNA de les cèl·lules control. Quan vam analitzar els resultats de les cèl·lules crescudes amb el 7% CS-FBS i tractades amb la 5-AZA, vam observar com els nivells de mRNA de la isoforma 1A d'AR es recuperaven, arribant als nivells de mRNA de les condicions control (figura 64A i B). Mitjançant PCR quantitativa a temps real es va quantificar aquesta disminució. Tal i com s'observa a la figura 64C, a les 72 hores de creixement amb 7% CS-FBS l'expressió de la isoforma 1A d'AR havia disminuït gairebé un 75% al comparar-la amb l'expressió de la mateixa isoforma en les condicions control. A l'analitzar les cèl·lules crescudes en deprivació hormonal conjuntament amb l'inhibidor de la metilació vam observar que no només es recuperava l'expressió de la isoforma 1A d'AR, sinó que els nivells de l'expressió de la isoforma 1A eren superiors als nivells de mRNA en condicions control.

A nivell de proteïna, mitjançant *western blot* i utilitzant un anticòs dirigit contra la part N-terminal de l'AR (ARN20), vam observar també que en la condició de deprivació hormonal durant 72 hores els nivells de proteïna d'AR disminuïen. Aquests nivells es recuperaven al créixer la línia cel·lular en condicions de deprivació hormonal juntament amb la 5-AZA durant 72 hores, sempre comparant amb els nivells d'AR de la condició control (figura 64D).

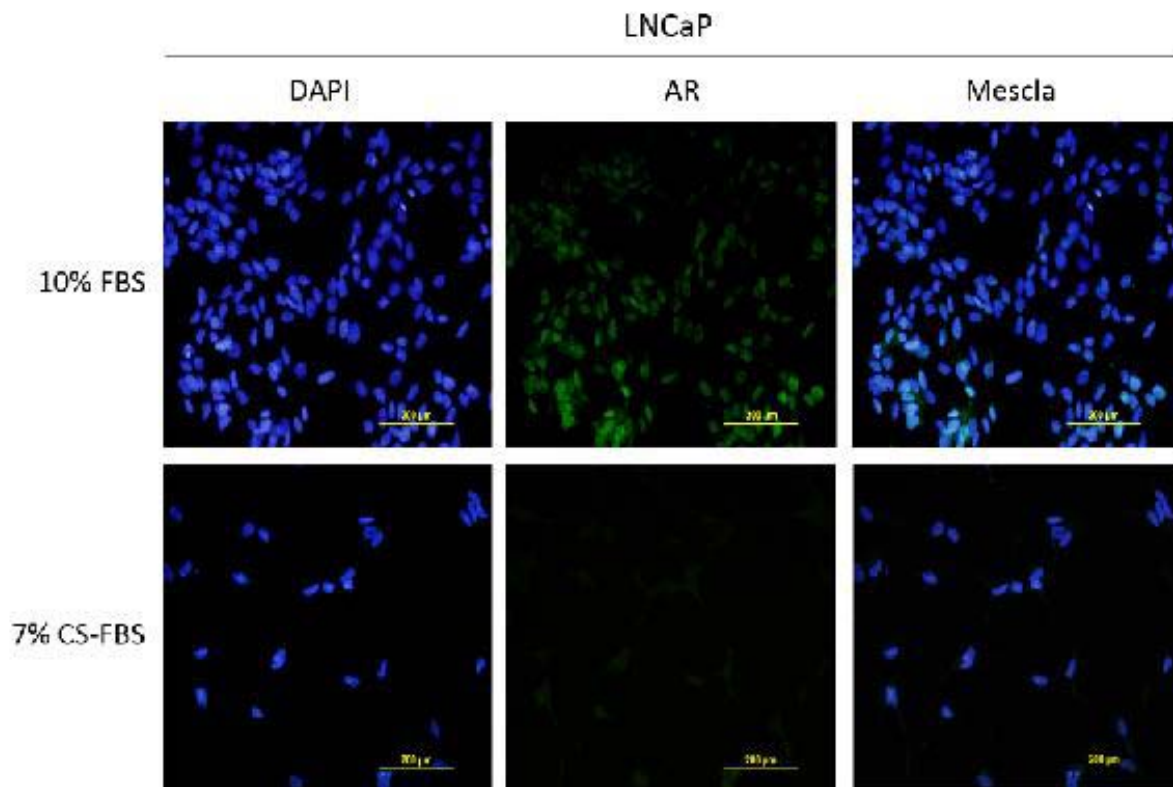


**Figura 64.** Anàlisi de l'expressió de la isoforma 1A d'AR en les LNCaP. **A) i B)** Anàlisi dels nivells de mRNA d'AR en les LNCaP crescudes durant 7 dies amb el 10% FBS (CONTROL), amb el 7% CS-FBS, i amb el 75 CS-FBS + 5-AZA 1  $\mu$ M mitjançant PCR sq. El gen ribosomal S18 humà s'ha utilitzat com a gen normalitzador de la quantificació. **C)** Quantificació dels nivells de mRNA de la isoforma 1A d'AR mitjançant PCR quantitativa a temps real a les LNCaP crescudes en les mateixes condicions que en **A**. El gen ribosomal S18 humà s'ha utilitzat com a gen normalitzador de la quantificació. La barra indica la desviació estàndard corresponent a 3 experiments independents. \* $p < 0,05$  i \*\* $p < 0,01$  comparat amb LNCaP control. **D)** Anàlisi de l'expressió de la proteïna d'AR en LNCaP crescudes en les mateixes condicions que en **A**, utilitzant un anticòs que reconeix la part N-terminal de l'AR.



#### 4.2.1 Detecció de la disminució del marcatge d'AR per la supressió hormonal de les cèl·lules

Es va realitzar una immunocitofluorescència per a detectar la presència i la localització subcel·lular de l'AR en les LNCaP crescudes en condicions control (10% FBS) i en condicions de privació hormonal (7% CS-FBS). En les imatges vam poder observar que les LNCaP crescudes amb el 10% FBS en el medi presentaven marcatge positiu i nuclear per a l'AR, indicant així l'expressió del receptor en aquestes cèl·lules. En les LNCaP crescudes en condicions de privació hormonal (7% CS-FBS), en canvi, no vam observar marcatge positiu per l'AR, indicant doncs que la supressió hormonal era capaç de silenciar l'expressió de l'AR en el nucli (figura 65).

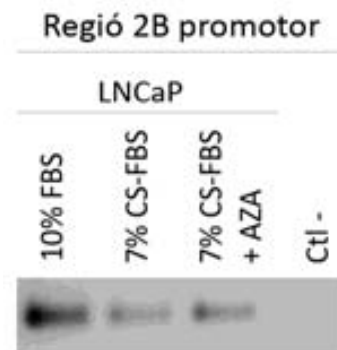


**Figura 65.** Detecció de l'expressió d'AR per immunocitofluorescència en LNCaP crescudes amb RPMI complementat amb el 10% FBS o amb 7% CS-FBS. S'han tenyit els nuclis amb DAPI (en blau) i el receptor d'andrògens (AR) en verd.

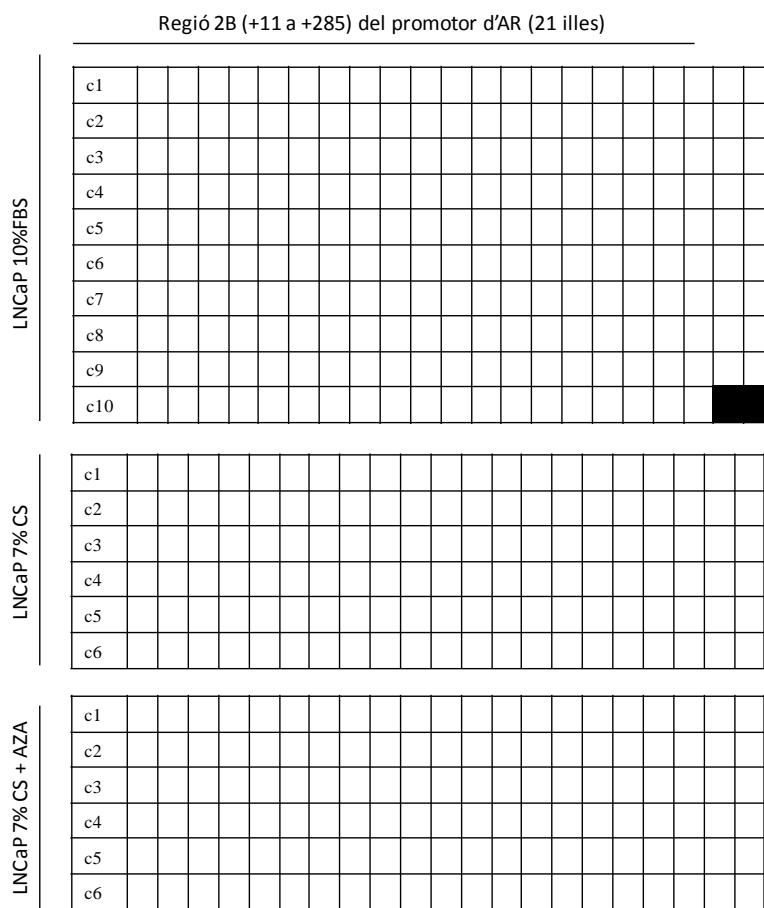
#### 4.2.2 Anàlisi de la metilació del promotor d'AR en les LNCaP deprivades d'hormones.

Com ja hem mencionat prèviament, la deprivació hormonal és una de les causes de metilació de les illes CpG dels promotors dels gens provocant el seu silenciament (Li et al., 2005; Li et al., 2008). Per aquesta raó vam voler analitzar si la disminució d'expressió de la isoforma 1A d'AR en les LNCaP crescudes en condicions de deprivació hormonal (7% CS-FBS) s'havia produït com a conseqüència de la metilació del seu promotor.

Es va realitzar la tècnica de *Bisulfite Specific PCR* (BSP), es van retallar les bandes obtingudes en aquesta amplificació (figura 66), es van clonar i finalment es van analitzar un mínim de 6 clons. El fragment de promotor que es va analitzar tenia una longitud de 274 nucleòtids, i estava localitzat en la zona codificant de l'exó 1A (regió 2B del promotor); en aquesta zona hi havia 21 illes CpG. Per a les LNCaP crescudes sense deprivació hormonal (10% FBS) es van analitzar 10 clons, dels quals 8 no presentaven cap illa metilada, mentre que dos d'ells presentaven les dues últimes illes metilades (figura 67). En les LNCaP crescudes en deprivació hormonal i en deprivació hormonal juntament amb l'agent desmetilant 5-AZA es van analitzar 6 clons, cap d'ells presentava cap illa metilada (figura 67). Es va analitzar també la regió promotora 2A en les LNCaP deprivades d'hormona durant 72 hores i com a resultat es va obtenir un clon amb una illa de les setze illes CpG metilada, i un segon clon amb dues illes CpG de setze metilades (no es mostren els resultats).



**Figura 66.** BSP per a la regió 2B del promotor (274 nt) de la isoforma 1A d'AR en les LNCaP control (10% FBS), en les deprivades d'hormona (7% CS-FBS) i en les deprivades més l'agent desmetilant (7% CS-FBS + AZA).



**Figura 67.** Esquema representatiu de les illes metilades (quadre negre) i no metilades (quadre blanc) en les LNCaP crescudes en medi complet (10% FBS), en deprivació hormonal (7% CS) i en deprivació hormonal més l'agent desmetilant (7% CS + AZA) en la posició +11 a + 285 del promotor de l'AR.

#### 4.2.3 Anàlisi dels llocs d'unió dels factors de transcripció del promotor 1A d'AR.

El fet de no trobar gairebé cap illa metilada en les dues zones del promotor analitzades en les LNCaP ens va dur a qüestionar-nos si el tractament no era prou llarg per produir metilació del DNA d'AR i, per tant, hauríem de canviar el model o el tractament, o bé que eren zones on hi havia possibles llocs d'unió de diversos factors de transcripció necessaris per a les funcions cel·lulars i presents en les diverses condicions analitzades. Per a elucidar el primer dubte es va utilitzar el model animal PAC120, del qual se'n mostren els resultats en els apartats 4.3, 4.4, 4.5 i 4.6. Per resoldre el segon es va realitzar una búsqueda dels possibles llocs d'unió dels factors de transcripció al promotor de la isoforma 1A d'AR mitjançant dos programes bioinformàtics: TF Search i TFBind. Per a determinar els potencials llocs d'unió dels factors de transcripció es van tenir en compte cada una de les regions del

promotor de la isoforma 1A d'AR. En la regió 1 la predicció resultant en els programes indicava que hi havia possibles llocs d'unió per als factors de transcripció GATA-1, NF-E, STE, LEF-1, Dof2 i 3, HSF1, GAL4 i AP-2. En la regió 2A els potencials factors de transcripció que s'hi podrien unir eren Egr-1, Sp1, NF1, LEF-1, E2F, AP2, ARD-1, EBP45 i RAF. En la regió 2B es va predir la possible unió de NF-1, MIG1, TFIID, AP2, RAF i c-ets-2. En la taula 18 s'especifica a quina illa CpG de cada regió s'uniria potencialment el factor de transcripció.

<b>Taula 18. Possibles llocs d'unió dels factors de transcripció en el promotor d'AR 1A</b>			
<b>Factor de transcripció</b>	<b>Regió 1</b>	<b>Regió 2A</b>	<b>Regió 2B</b>
<b>GATA-1</b>	Illla 1		
<b>NF-E</b>	Illla 1		
<b>STE</b>	Illla 3		
<b>LEF-1</b>	Illla 4	Illla 4, 6, 7 i 8	Illla 13
<b>Dof2 i 3</b>	Illla 4	Illla 6	
<b>HSF-1</b>	Illla 4		
<b>GAL4</b>	Illla 4	Illla 7 i 8	
<b>AP-2</b>	Illla 4	Illla 6, 7 i 8	Illla 7
<b>Egr-1</b>		Illla 2	
<b>SP-1</b>		Illla 2, 6, 7 i 8	
<b>NF-1</b>		Illla 3, 6, 7 i 8	Illla 4, 7, 8 i 11
<b>E2F</b>		Illla 5	
<b>ADR-1</b>		Illla 6, 7 i 8	
<b>RAF</b>		Illla 12	Illla 20
<b>EBP-45</b>		Illla 13	
<b>c-Ets-2</b>		Illla 6, 7 i 8	Illla 20
<b>MIG1</b>			Illla 7
<b>TFIID</b>			Illla 7

#### **4.3 ANÀLISI DEL CREIXEMENT DEL TUMOR DE PRÒSTATA EN EL MODEL ANIMAL PAC120 EN ELS DIFERENTS TRACTAMENTS.**

Per a poder demostrar que la teràpia de la deprivació hormonal prolongada produïa metilació del promotor del receptor d'andrògens i conseqüentment un silenciament del gen, es va utilitzar el model animal PAC120, ja que aquest sí que ens permetia realitzar tractaments diversos i molt més prolongats que no pas en el model cel·lular. En la taula 19 s'han recollit les mitjanes  $\pm$  la desviació estàndard de les dades que fan referència al pes inicial de l'animal (abans de la implantació del tumor), el pes final de l'animal i el volum del

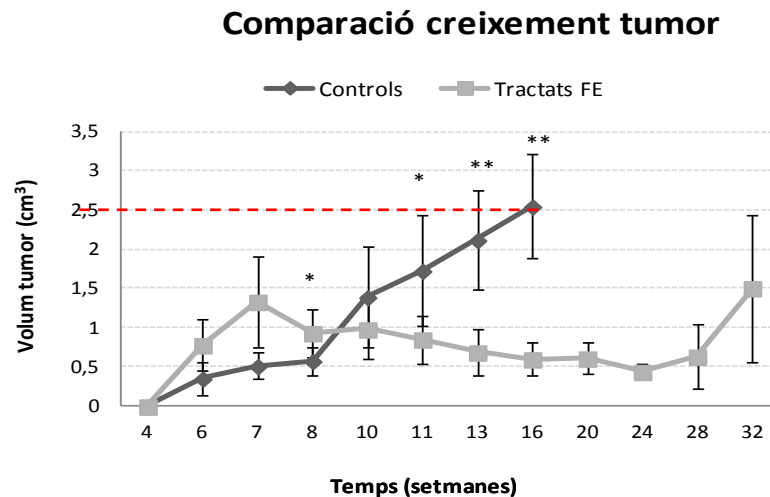
tumor (en cm<sup>3</sup>), per a cada grup de tractament. El grup d'animals *Swiss nude* és un grup al qual no se li va implantar tumor i que es va utilitzar per comprovar que ni el FE200486 ni la 5-AZA no eren tòxics per als animals. Si ens fixem en el volum del tumor podem veure que els animals sotmesos a diferents tractaments presenten menor creixement tumoral que els animals control.

**Taula 19. Recull del nombre d'animals tractats, el seu pes i el volum del tumor**

<b>TRACTAMENT</b>	<b>CONTROL (N=6)</b>	<b>FE 200486 (N=6)</b>	<b>FE +5-AZA (N=4)</b>	<b>FE constant (N=6)</b>	<b>Swiss nude (N=3)</b>
<b>PES INICIAL ANIMAL, g</b>	27,27 ± 2,01	31,33 ± 1,49	27,76 ± 1,32	31,3 ± 2,63	32,13 ± 3,6
<b>PES FINAL ANIMAL, g</b>	33,55 ± 3,38	38,73 ± 6,15	34,35 ± 3,42	33,57 ± 3,23	38,6 ± 5,34
<b>VOLUM TUMOR, cm<sup>3</sup></b>	2,55 ± 0,66	1,5 ± 0,94	2,17 ± 0,36	0,52 ± 0,1	.....
<b>TEMPS CREIXEMENT TUMORAL, setmanes</b>	10 – 16	28 - 32	32 - 36	32 – 36	.....

Al comparar el volum del tumor dels animals tractats amb FE200486 (n=6) amb el volum del tumor dels animals control (n=6) vam observar que el creixement del tumor en els tractats era, de mitjana, un cm<sup>3</sup> inferior. En el gràfic (figura 68) es pot observar que en les setmanes 6, 7 i 8 el creixement del tumor dels animals tractats amb FE200486 era superior al creixement tumoral dels control. En el cas dels animals tractats amb FE200486 es va començar a injectar subcutàniament a la setmana 5 de la implantació del tumor, i fins a la segona dosi (setmana 7) no va començar a fer l'efecte en el creixement tumoral; com es pot apreciar en el gràfic, a la setmana 8 començava a retrocedir el volum tumoral en els animals tractats amb FE200486. Aquest retrocés en el volum es mantenia fins a la setmana 28 de la implantació del tumor, on semblava que començava a augmentar de volum, com es confirmà a la setmana 32. Aquesta disminució respecte del volum inicial del tumor i el manteniment del no creixement en els animals tractats amb FE200486 era significatiu estadísticament a partir de la setmana 11, tal i com es mostra en la figura 68.

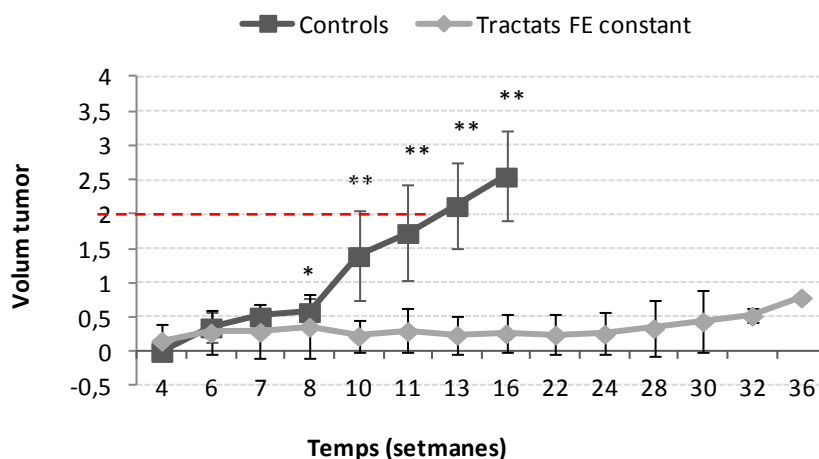
Per als animals control només es mostra el creixement tumoral fins a la setmana 16 de la implantació del tumor ja que era en aquest període on assumien el volum tumoral màxim permès pel comitè ètic animal (es marca en el gràfic amb una línia vermella discontinua).



**Figura 68.** Gràfic on es mostra el volum del tumor en els ratolins tractats amb FE200486 de manera intermitent i el volum del tumor en els ratolins control (n= 6 per ambdós grups). La barra indica la desviació estàndard. \*p<0,05 i \*\*p<0,01 comparant el tractament amb FE200486 amb els animals control. La barra vermella discontinua indica el volum tumoral màxim permès pel comitè ètic animal.

Al fer la comparació entre el volum del tumor dels animals tractats amb FE200486 de manera constant (FE200486 constant) amb el del tumor dels animals control vam observar com el volum del primer grup romaní a sota dels 0,5 cm<sup>3</sup> fins a la setmana 32, on s'igualava aquest volum, i a partir de la setmana 36 començava a augmentar lleugerament. Per analitzar el creixement tumoral més enllà de les 36 setmanes es necessitava fer el seguiment en un nou animal, tractat prèviament a la implantació tumoral amb FE200486 durant un mes (figura 69). Es van tractar sis animals. Només en un d'ells el tumor va començar a créixer al cap de 6 setmanes de ser trasplantat. En els animals control no vam poder mesurar el volum tumoral més enllà de les 16 setmanes perquè superava el límit permès pel comitè ètic animal.

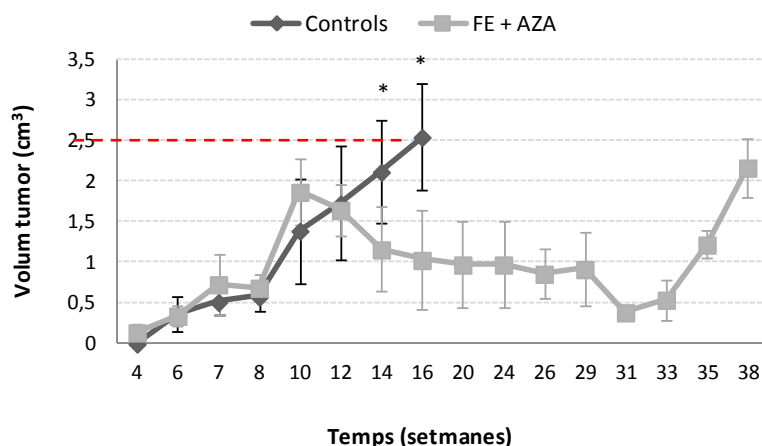
## Comparació creixement tumor



**Figura 69.** Gràfic on es mostra el volum del tumor dels ratolins tractats amb FE200486 de manera constant (n=6) i el volum del tumor dels ratolins control (n= 6). La barra indica la desviació estàndard. \* $p < 0,05$  i \*\* $p < 0,01$  comparant el tractament amb FE200486 amb els animals control. La barra vermella discontinua indica el volum tumoral màxim permès pel comitè ètic animal.

La tercera comparació es va realitzar entre el grup d'animals control i el grup d'animals tractats amb FE200486 + 5-AZA. En aquesta comparació vam poder observar que els animals control presentaven un creixement constant del tumor fins a la setmana 16, on van ser sacrificats per presentar el volum màxim permès del tumor. El grup d'animals en cotractament (FE200486 + 5-AZA) va tenir un comportament diferent del creixement tumoral. A la setmana 6 de la implantació tumoral es van començar a tractar amb la 5-AZA amb injecció intraperitoneal, tres dies consecutius a la setmana. Es van tractar només amb la 5-AZA durant dues setmanes (fins a la setmana 8) i llavors es va començar també el tractament amb FE200486. Com es pot observar en el gràfic (figura 70) no hi va haver recessió del volum del tumor dels animals cotractats fins a la setmana 12, després de la segona dosi de FE200486. El retrocés del volum del tumor no va ser tan ràpid en els animals cotractats com en els tractats només amb FE200486, però el volum va anar disminuint fins arribar als  $0,5 \text{ cm}^3$  la setmana 31 i 33 després de la implantació. I va ser a partir de la setmana 33 quan el tumor va créixer gairebé exponencialment fins a la setmana 38, on es van sacrificar els animals cotractats. Les diferències entre els volums dels animals control i dels cotractats va ser significativa en les setmanes 14 i 16 (figura 70).

## Comparació creixement tumor

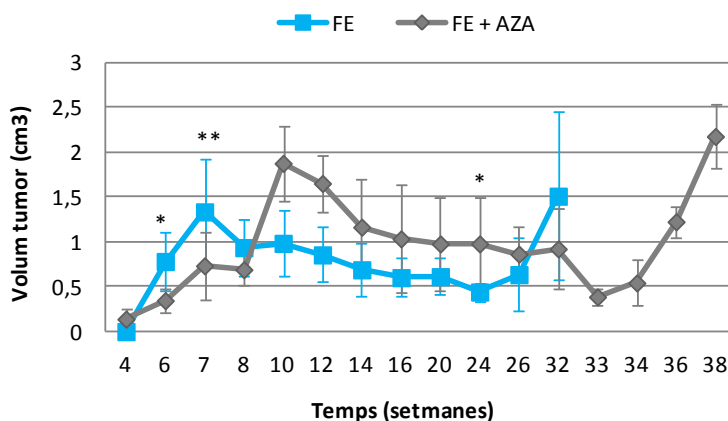


**Figura 70.** Gràfic on es mostra el volum del tumor dels ratolins tractats amb FE200486 + 5-AZA (n=4) i del tumor dels ratolins control (n= 6). La barra indica la desviació estàndard. \*p<0,05 comparant el tractament amb FE200486 amb els animals control. La barra vermella discontinua indica el volum tumoral màxim permès pels comitès ètics animals.

Una altra comparació que es va fer va ser entre els animals tractats amb FE200486 i els tractats amb FE200486 + 5-AZA. En aquesta comparació vam observar com en tots dos tractaments es seguia un patró de creixement molt similar, però desplaçat en el temps. Així doncs, els animals tractats amb FE200486 presentaven un creixement del volum tumoral a la setmana 7 després de la implantació tumoral (segona dosi de FE200486) i a partir d'aquí començava a disminuir. Pels animals tractats amb FE200486 + 5-AZA, la disminució del creixement començava després de la setmana 10, on ja s'havia administrat la segona dosi del FE200486. En tots dos grups disminuïa el volum del tumor, essent més progressiu i lent en els animals cotractats amb FE200486 + 5-AZA ja que també es va assolir un volum tumoral més gran abans del tractament amb FE200486 (figura 71).



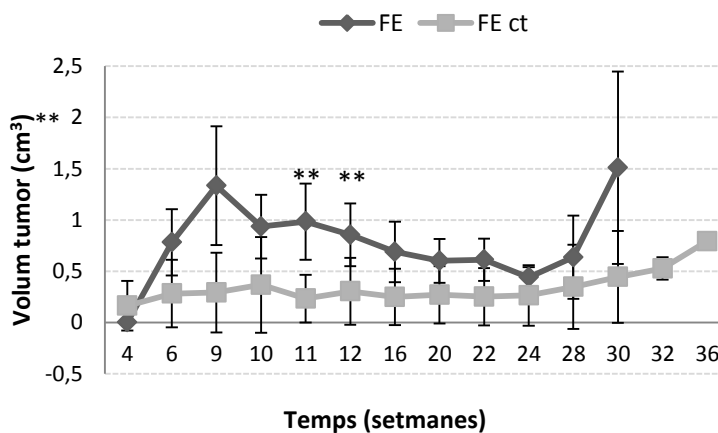
### Comparació creixement tumor



**Figura 71.** Gràfic on es mostra el volum del tumor dels ratolins tractats amb FE200486 + 5-AZA (n=4) i el volum del tumor dels ratolins tractats amb FE200486 de manera intermitent (n=6). La barra indica la desviació estàndard. \*p<0,05 i \*\*p<0.01 al comparar els tractaments.

L'última comparació es va fer entre els animals tractats amb FE200486 de manera intermitent i els animals tractats amb FE200486 de manera constant. Tal i com es pot observar al gràfic els ratolins tractats amb FE200486 presenten un volum tumoral una mica superior al volum del tumor dels ratolins que estaven tractats amb FE200486 constant. A més a més vam poder observar que el tumor començava a créixer abans (entre la setmana 28 i 30) en els animals tractats amb FE200486 respecte del tumor dels animals tractats amb FE200486 de manera constant (figura 72).

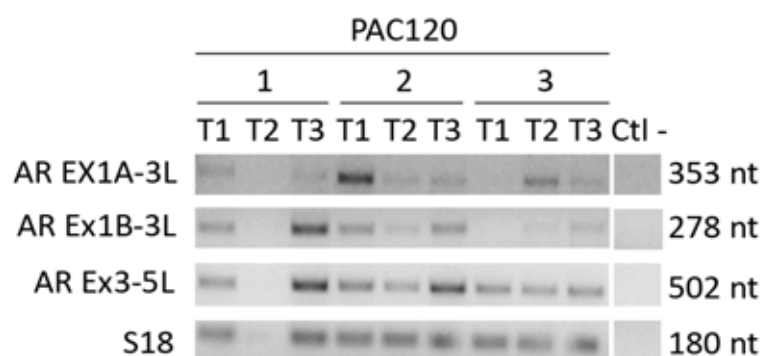
### Comparació creixement tumor



**Figura 72.** Gràfic on es mostra el volum del tumor dels ratolins tractats amb FE200486 intermitent (n=6) i el volum del tumor dels ratolins tractats amb FE200486 de manera constant (n= 6). La barra indica la desviació estàndard. \*\*p<0.01 al comparar tots dos tractaments.

#### 4.4 ANÀLISI DELS NIVELLS DE mRNA I DE PROTEÏNA D'AR EN EL MODEL ANIMAL PAC120 EN CONDICIONS DE DEPRIVACIÓ HORMONAL

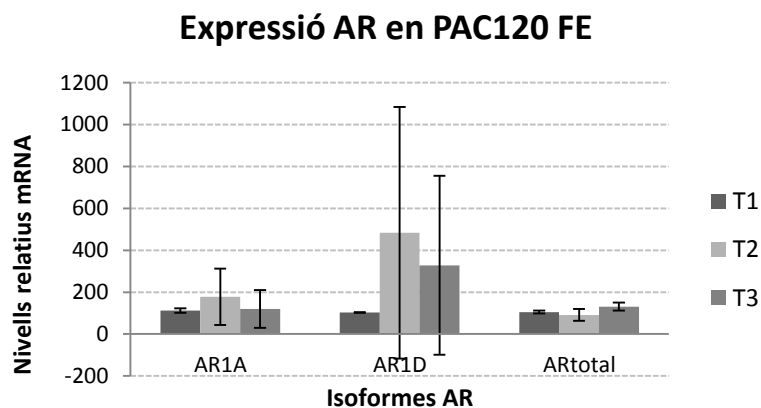
Un cop acabats els tractaments en els animals portadors del *xenograft* de càncer de pròstata, es van sacrificar i es va procedir a realitzar diferents anàlisis. En el primer estudi es va realitzar una PCR sq amb el teixit tumoral de tres animals tractats amb FE200486 de manera intermitent, utilitzant encebadors específics del primer exó 1A i 1B d'AR així com també encebadors que reconeixien des de l'exó 3 fins a l'exó 8 de l'AR. Per a tots tres animals es va utilitzar també el gen ribosomal S18 humà com a normalitzador de la expressió. Tal i com s'observa en la figura 73, vam comprovar que per a totes tres amplificacions (1A, 1B i AR) els animals 1 i 2 presentaven nivells de mRNA d'AR més baixos en el T2 (màxima supressió hormonal) que en el T1 (moment de la implantació del tumor). En el T3 (temps màxim després de l'alliberació de la supressió) recuperaven els nivells de mRNA d'AR, respecte els nivells de mRNA del T2. L'animal 3, però, no seguia aquest patró. A més, si observàvem els nivells de mRNA amplificats a l'utilitzar el gen ribosomal humà S18, en l'animal 1 comprovàvem que no hi havia cDNA motlle per a amplificar en la PCR sq (figura 73). Van considerar que la variabilitat de les dades i la falta d'amplificació de S18 humà en alguns casos era degut a què el tumor era una barreja de cèl·lules epitelials humanes i cèl·lules estromals murines, i la proporció d'ambdues variava segons el tractament fent variar els nivells de mRNA d'AR humà quantificats.



**Figura 73.** Anàlisi de l'expressió del mRNA d'AR del *xenograft* PAC120 (tumor) dels animals tractats amb FE200486 intermitent, mitjançant PCR sq. El gen S18 s'ha utilitzat com a gen normalitzador de l'expressió.

Es va decidir realitzar PCR quantitativa a temps real per confirmar les variacions d'expressió d'AR observades en la PCR sq. En la PCR quantitativa no només es van quantificar els nivells de mRNA d'AR 1A, sinó que es van incloure l'amplificació de la isoforma 1D i l'amplificació de la part comuna a tots els trànscrips d'AR; es van analitzar tots els tractaments.

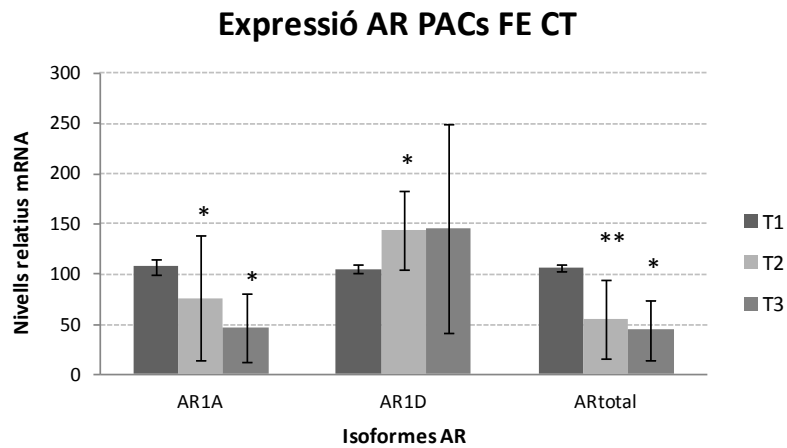
Primerament es van analitzar els resultats obtinguts en la PCR quantitativa dels tumors dels animals tractats amb FE200486 de manera intermitent per a les isoformes 1A i 1D, així com també es van quantificar els nivells de mRNA de la part d'AR comuna a tots els trànscrips (figura 74). A l'analitzar els nivells de mRNA d'AR de la part comuna no vam veure cap canvi significatiu en l'expressió del mRNA d'AR entre els 3 temps (T1, T2 i T3), tot i que semblava que hi havia una petita disminució en el temps T2. En canvi, a l'analitzar les isoformes 1A i 1D vam veure que presentaven un patró similar; els nivells de mRNA eren superiors en el T2 que en el T1 per a totes dues isoformes. Observant què passava en el T3 vam veure que per a 1A es mantenien els nivells d'expressió en el T3 com en el T1, és a dir, havien disminuït respecte dels nivells de T2. Per a 1D, els nivells d'expressió en T3 havien disminuït respecte de T2, però estaven molt per sobre dels nivells d'AR en el T1 (figura 74).



**Figura 74.** Gràfic on es mostra l'expressió de mRNA d'AR en els tumors dels ratolins tractats amb FE200486 de manera intermitent (n=6). La barra indica la desviació estàndard.

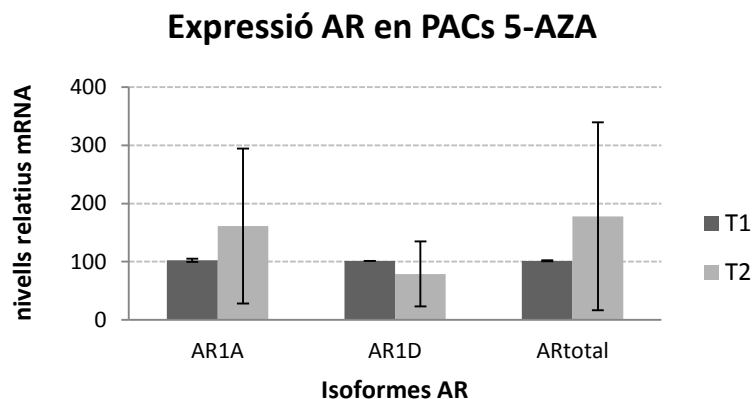
Els resultats dels nivells d'expressió de mRNA d'AR obtinguts dels tumors dels animals tractats amb FE200486 de manera constant mostraven resultats diferents dels tractats amb FE200486 de manera intermitent (figura 75). Per a l'AR 1A, vam detectar una disminució significativa de l'expressió d'aquest trànscrip tant a T2 com a T3, en comparació amb els nivells d'1A en T1. Per a AR 1D vam veure que els nivells de mRNA, enlloc de disminuir,

havien augmentat tant a T2 com a T3. En canvi, al quantificar els nivells de mRNA d'AR total vam veure un patró molt similar a 1A, és a dir, una disminució dels nivells de mRNA d'AR total en T2 i en T3; totes dues disminucions eren significatives estadísticament. D'aquests resultats podem concloure que el tractament constant amb FE200486 sí reduiria els nivells de mRNA d'AR.



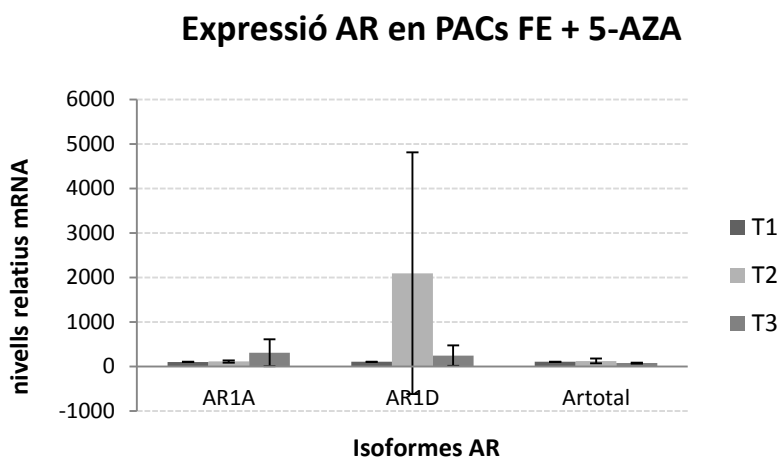
**Figura 75.** Gràfic on es mostra l'expressió de mRNA d'AR en els tumors dels ratolins tractats amb FE200486 de manera constant (n=6). La barra indica la desviació estàndard..

Es va analitzar els nivells de mRNA d'AR en els tumors dels ratolins tractats amb l'agent desmetilant, la 5-AZA (figura 76). En aquests tumors els nivells de mRNA tant de l'1A com de la part comuna de tots els transcrits d'AR total van augmentar després del tractament amb la 5-AZA, tot i no tenir significació estadística, indicant així que es podia evitar la metilació del promotor i reexpressar o augmentar els nivells de mRNA d'AR. En canvi, l'AR 1D no semblava que patís cap canvi en els nivells d'expressió del seu mRNA, resultat esperat ja que el promotor de l'AR 1D no presenta illes CpG.



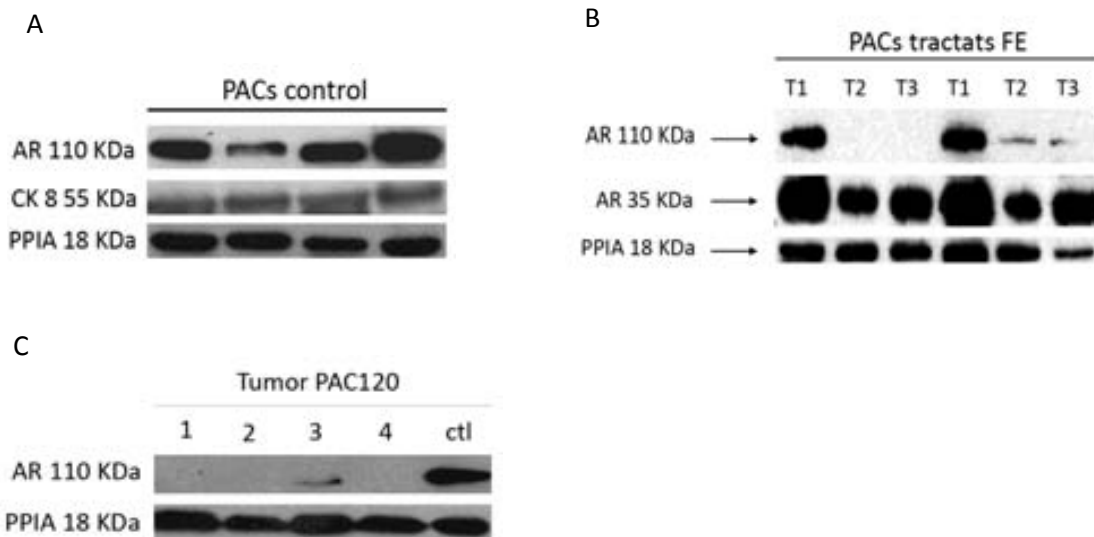
**Figura 76.** Gràfic on es mostra l'expressió de mRNA d'AR en els tumors dels ratolins tractats amb FE200486 de manera constant (n=6). La barra indica la desviació estàndard.

Finalment es van analitzar els resultats obtinguts per als animals cotractats amb FE200486 + 5-AZA (figura 77). Al quantificar els nivells de mRNA d'AR 1A vam veure que no hi havia canvis d'expressió entre el T1 i el T2, mentre que en el T3, al final del cotractament, s'observava un lleuger augment dels nivells de mRNA d'1A. Per a l'AR 1D veiem que en el T2 hi havia un augment molt gran dels nivells de mRNA, nivells que disminuïen en el T3 (tot i ser superiors als nivells en el T1). Els nivells de mRNA d'AR total, en canvi, en mantenien constants en el T1 i T2, i disminuïen en el T3 (figura 77).



**Figura 77.** Gràfics on es mostra l'expressió de mRNA d'AR en els tumors dels ratolins tractats amb FE200486 més 5-AZA (n=4). La barra indica la desviació estàndard. S'ha calculat mitjançant PCR quantitativa a temps real amb encebadors específics d'1A, 1D i de la zona comuna d'AR.

A nivell de proteïna, mitjançant *western blot*, vam poder observar els nivells de proteïna d'AR en els tumors procedents dels animals control i dels tractats. Es va utilitzar un anticòs que reconegué l'extrem C-terminal de la proteïna AR (zona comuna a totes les isoformes de l'AR). A l'analitzar els resultats obtinguts per a la isoforma de 110 KDa vam comprovar com els animals control presentaven aquesta banda (figura 78A), per tant, tots ells expressaven l'AR 1A de 110 KDa. En els animals tractats amb FE200486 de manera intermitent vam veure la presència d'aquesta banda de 110 KDa en el T1 (mostra agafada abans de la implantació del tumor). Mentre que en un dels animals en el T2 (màxima supressió hormonal) la presència de banda desapareixia completament i no es reexpressava en el T3, en l'altre animal disminuïa la banda de 110KDa en el T2 i es mantenia poc expressada en el T3 (màxim alliberament de la supressió; figura 78B). Quan observàvem la banda de 35 KDa, que podria correspondre a la proteïna codificada per les isoformes 1C, 1D i/o 1E, vèiem una major expressió per l'AR a temps T1, i aquesta expressió disminuïa en el T2 i semblava que es recuperava, tot i no arribar als mateixos nivells que en el T1, al T3. Aquests canvis en l'expressió de l'AR de 35 KDa els observàvem en tots dos animals. A l'analitzar l'expressió de la proteïna AR en quatre dels sis animals tractats amb FE200486 de manera constant només vam detectar la banda de 110 KDa en un dels animals (figura 78C). La banda de 35 KDa tampoc no es va detectar.

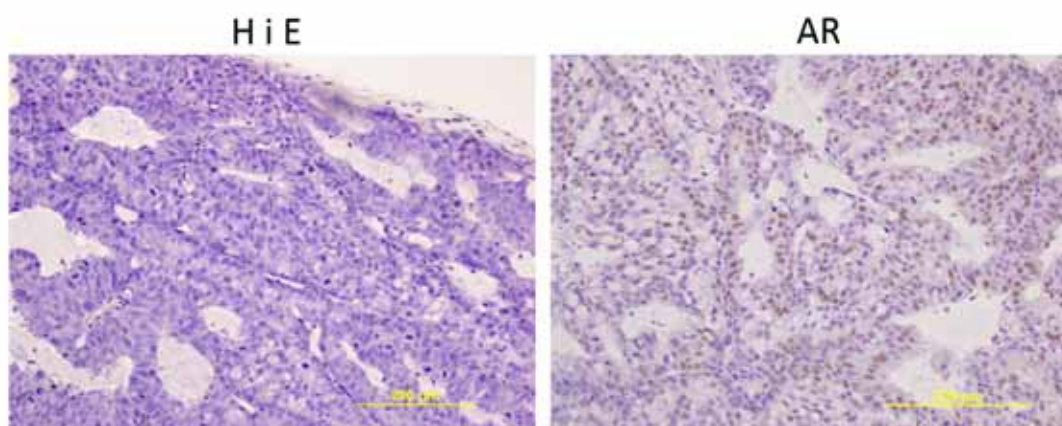


**Figura 78.** Anàlisi de l'expressió de la proteïna d'AR dels tumors dels animals control (**A**), en els tumors dels animals tractats amb FE200486 de manera intermitent (**B**) i en els tumors dels animals tractats amb FE200486 de manera constant (**C**, animal 1, 2, 3 i 4) utilitzant l'anticòs ARC19. S'ha utilitzat el gen PPIA com a gen normalitzador de la càrrega.

#### 4.5 DETERMINACIÓ DE L'EXPRESSION DE LA PROTEÏNA D'AR EN EL MODEL ANIMAL PAC120 I ESTUDI HISTOLÒGIC DEL TUMOR

El model animal PAC120 va ser proporcionat per la Dra. Poupon i els seus col·laboradors, que van analitzar el perfil genètic del tumor de pròstata humana trasplantat en ratolins nusos.

Per a assegurar-nos que durant els passatges del *xenograft* d'animal en animal el tumor mantenia les característiques descrites a la introducció de la tesi, vam realitzar una primera tinció amb hematoxilina i eosina (H i E) per comprovar la morfologia i el *Gleason* del tumor, i una segona tinció contra el receptor d'andrògens (AR) per confirmar que expressava l'AR. Com es pot observar en la figura, en la tinció H i E vam veure com el tumor presentava un alt grau mitòtic així com també un *Gleason* 9 (4 + 5). A més a més, la tinció per l'AR era positiva en el nucli, per tant, el model continuava mantenint les seves característiques després d'uns quants passatges en el nostre laboratori (figura 79).



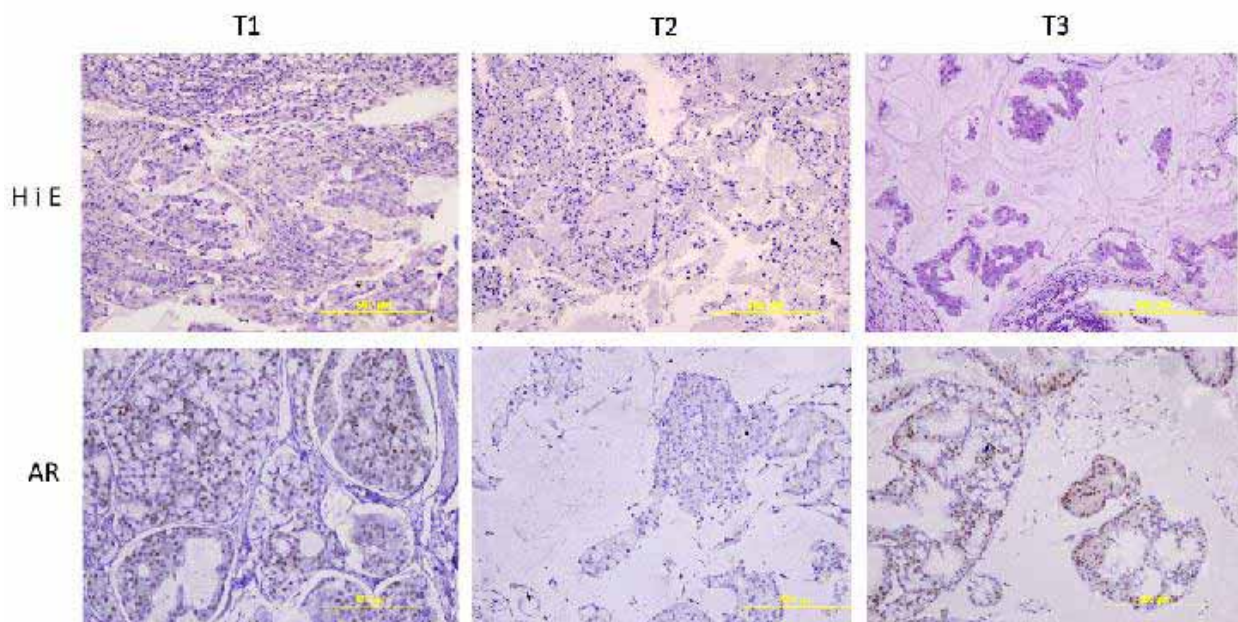
**Figura 79.** Immunohistoquímica per l'AR i tinció amb hematoxilina i eosina (H i E) en seccions de tumor d'animals control.

Com que a través de *western blot* no es van poder determinar els nivells d'expressió d'AR en alguns dels ratolins tractats, es va optar per analitzar, mitjançant la immunohistoquímica, la presència o absència de tinció per l'AR en els diferents tractaments realitzats en els ratolins.

En la figura 80 es poden observar els canvis morfològics de les glàndules que formen el tumor en els diferents moments del tractament amb FE200486 conjuntament amb la 5-AZA. Així doncs, en la tinció amb H i E en el T2 vam poder observar com hi havia hagut una

lleugera disminució en la quantitat de cèl·lules epitelials així com també un lleuger canvi en l'organització del tumor. En el T3, aquest canvi estructural del tumor i la disminució del nombre de cèl·lules epitelials era molt més evident que en el T2. El tumor mantenia un *Gleason 9* (figura 80).

En la tinció per l'AR vam veure com el tumor presentava marcatge positiu i nuclear en el T1; a T2 aquesta tinció positiva desapareixia i tornava a reaparèixer en el T3, i era també nuclear. En el tall per a T3 tenyit contra l'AR es podia observar també aquesta millor distribució en glàndules més definides que el tumor havia adoptat després del cotractament amb FE200486 + 5-AZA (figura 80).



**Figura 80.** Immunohistoquímica per l'AR i tinció amb hematoxilina i eosina (H i E) en seccions de tumor d'animals tractats amb FE200486 + 5-AZA. T1, T2 i T3 representen els 3 temps de tractament.

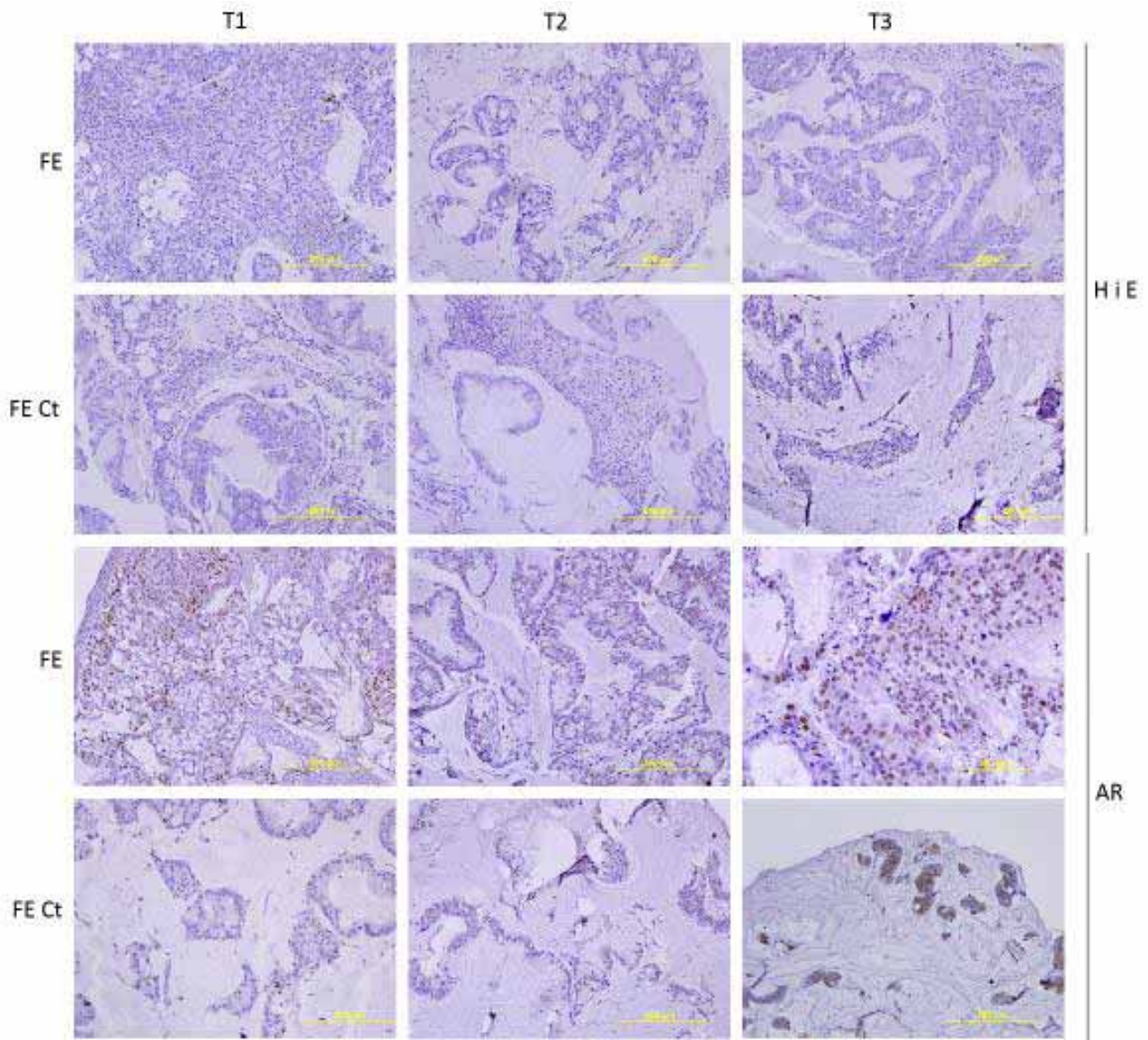
Seguidament es van voler analitzar els possibles canvis morfològics provocats pel tractament amb FE200486 (intermitent o constant) així com també la presència o absència de la proteïna d'AR i la seva localització cel·lular.

Analitzant les tincions amb H i E en els animals tractats amb FE200486 de manera intermitent vam poder observar que a T2 hi havia una disminució de les cèl·lules epitelials i gairebé no quedaven glàndules en el moment màxim de la supressió hormonal (T2). En el T3, 90 dies després d'alliberar l'animal de la supressió hormonal, vam poder apreciar com el



nombre de glàndules i cèl·lules epitelials s'havia recuperat. En els tractats amb FE200486 de manera constant s'apreciava en el seu T1 (moment d'implantació del tumor) una morfologia tumoral semblant a la del T3 dels animals tractats amb FE200486 de manera intermitent. En el T2 i el T3 del tumor dels animals tractats amb FE200486 constant ja no vam poder distingir glàndules clarament definides (gairebé inexistent) i la quantitat de cèl·lules epitelials era molt menor (figura 81).

A l'analitzar la presència d'AR a través de la tinció immunohistològica vam comprovar que el T1 en el tumor dels ratolins tractats amb FE200486 de manera intermitent presentava un marcatge positiu per l'AR i una localització nuclear, mentre que en T2 la tinció per AR es perdia. En el T3 es recuperava aquesta positivitat per l'AR i semblava més intensa; era nuclear en gairebé el 100% de les cèl·lules epitelials, comparant amb el seu propi T1. En canvi, a l'analitzar la tinció d'AR en el tumor dels ratolins tractats amb FE200486 de manera constant vam observar que en les poques glàndules que quedaven en el teixit tumoral prostàtic en el T1 i T2 no hi havia tinció per l'AR. Contràriament, en el T3 s'apreciava tinció per l'AR. Aquesta tinció era nuclear en algunes cèl·lules epitelials mentre que en d'altres era clarament citoplasmàtica (figura 81).

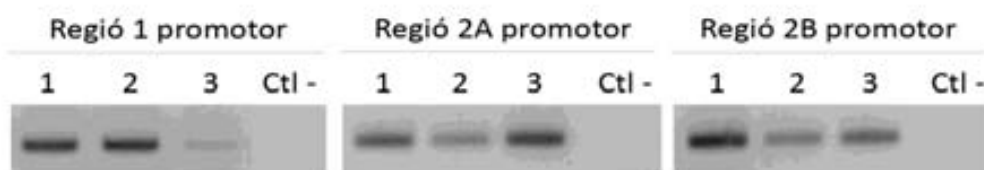


**Figura 81.** Tinció amb hematoxilina i eosina (H i E) i immunohistoquímica per l'AR en seccions de tumor d'animals tractats amb FE200486 de manera intermitent (fila 1 i 3) i amb FE200486 de manera constant (filera 2 i 4). T1, T2 i T3 representen els 3 punts clau en el tractament.

#### **4.6 ANÀLISI DE LA METILACIÓ DEL PROMOTOR D'AR EN ELS TUMORS DEL PAC120 TRACTATS AMB FE200486.**

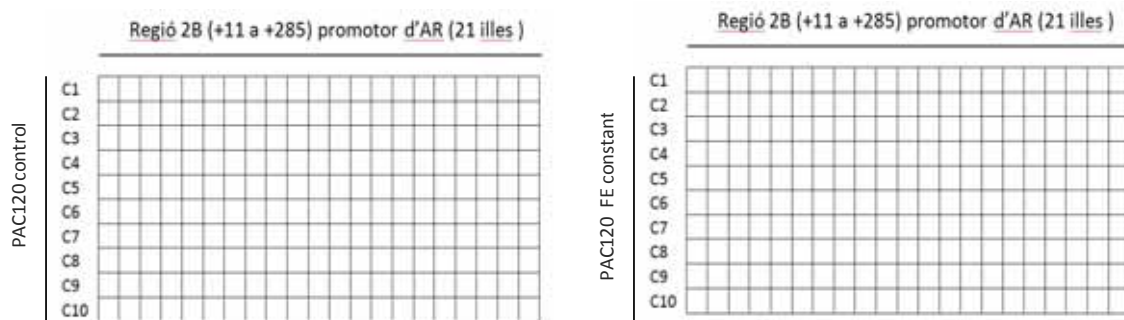
Es va realitzar la tècnica de BSP, com en les LNCaP, per a amplificar les tres regions del promotor d'AR (figura 27 de materials i mètodes). Es van retallar les bandes obtingudes en la BSP (figura 82), es van clonar i finalment es van analitzar un mínim de 10 clons per a fer fiables els resultats. L'anàlisi de la metilació del promotor es va fer primerament amb dos animals tractats només amb FE200486 de manera intermitent; es van analitzar 10 clons per

a cada temps de recollida de mostra durant el tractament (T1, T2 i T3) i per a cada animal. Per a totes tres regions del promotor de la isoforma 1A d'AR establertes no vam trobar cap illa metilada, excepte en un animal, que presentava dos clons amb una illa metilada cada un d'ells en la regió 2B i en el T3 (temps màxim després de l'alliberament de la supressió hormonal). Com que en aquests dos animals no vam detectar metilació en el promotor de l'AR, es va decidir analitzar la metilació del promotor de 3 animals tractats amb FE200486 de manera constant; es va analitzar també la metilació de les tres zones del promotor en un animal control. El tumor del PAC120 control no presentava cap illa metilada en cap de les tres regions (regió 1, 2A i 2B) del promotor. Per als animals tractats de manera constant amb el FE200486 primerament es va analitzar la zona del promotor situada entre -593 i -302 (regió 1) respecte de l'inici de transcripció; en aquesta regió hi havia 7 illes CpG. Es van analitzar 10 clons dels quals un no va presentar metilació en cap de les 7 illes CpG, mentre que la resta presentava un mínim de dues illes de les 7 metilades. Hi havia clons com el 4, 6, 9 i 10 que presenten fins a 4 illes metilades (figura 83A). Seguidament es va analitzar una part del promotor d'AR més pròxima a l'inici de transcripció, la regió 2A, situada entre -299 i +30 nucleòtids (16 illes CpG). Vam escollir 10 clons dels quals 3 (el 1, 3 i 10) presentaven un patró idèntic de metilació d'illes, concretament de la 1 a la 5, de la 7 a la 10 i de la 12 a la 16 (figura 83B). Finalment es va analitzar la regió 2B (+11 a +285) del promotor de la isoforma 1A d'AR utilitzant 10 clons resultants del procés de clonatge de la banda de BSP. En aquesta regió cap d'ells no presentava cap parella CpG metilada en els animals tractats amb FE200486 de manera constant (figura 83C).

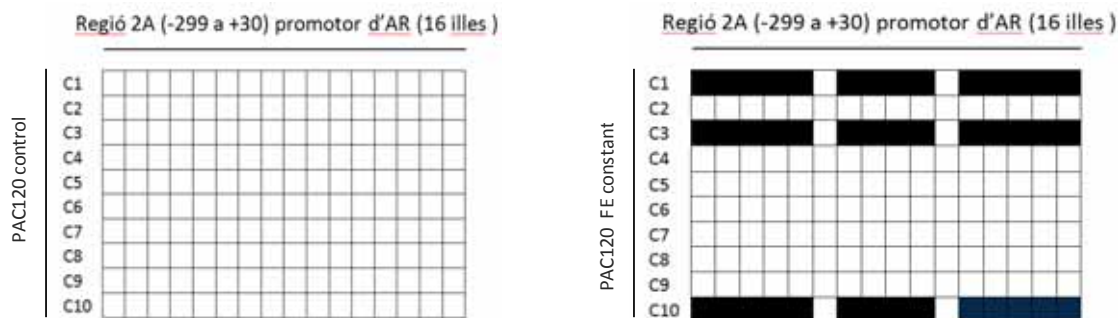


**Figura 82.** Resultat de la BSP-PCR per a les 3 regions del promotor realitzada amb tres tumors procedents de tres animals tractats amb FE200486 de manera constant. Regió 1: de -593 a -302 (291 nt), regió 2A: de -299 a +30 (269 nt), regió 2B: de +11 a +285 (274 nt). La posició de les regions està calculada a partir de l'inici de transcripció de la isoforma 1A d'AR.

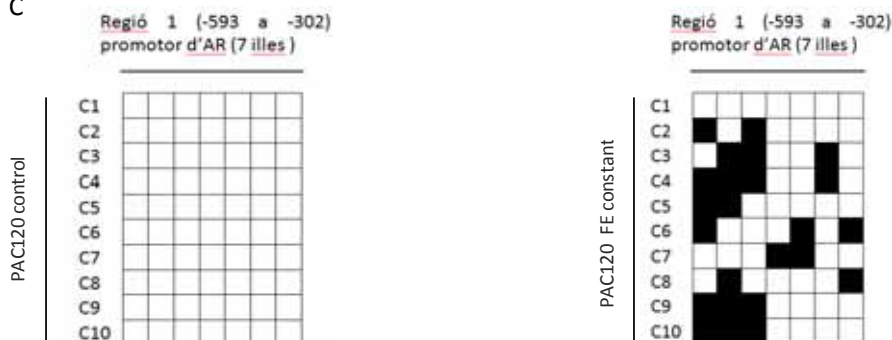
A



B



C

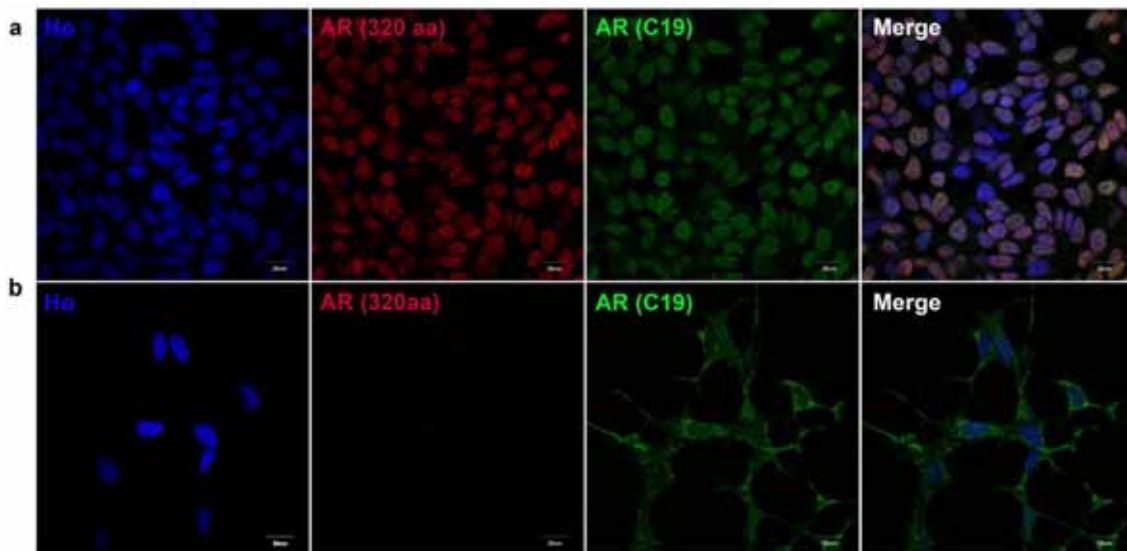


**Figura 83.** Anàlisi de la metilació del promotor de l'AR dels tumors dels animals control, dels tractats amb FE200486 i dels tractats amb FE200486 de manera constant. **A)** anàlisi de la part del promotor situada del nucleòtid + 11 al +285. **B)** anàlisi de la zona del promotor situada entre els nucleòtids -593 i -302. **C)** anàlisi de la metilació de la zona compresa entre els nucleòtids -299 i +30. Els quadrats negres plens representen metilació d'una parella CG. Els quadrats buits representen una parella CG no metilada.

#### 4.7 ANÀLISI DE LA LOCALITZACIÓ CEL·LULAR D'AR EN LNCaP

Per determinar si les diferents condicions de creixement de les LNCaP (medi amb 10% FBS o amb 7% *CS*-FBS) produïen un canvi en la localització cel·lular de l'AR, vam realitzar estudis d'immunocitofluorescència amb aquesta línia cel·lular utilitzant dos anticossos diferents de l'AR (contra la regió N-terminal i contra la C-terminal). En les LNCaP crescudes amb RMPI al 10% FBS; figura 84a), la localització de l'AR era principalment nuclear, tant amb l'anticòs que reconeixia la part N-terminal (vermell) com amb l'anticòs que reconeixia l'extrem C-terminal (verd).

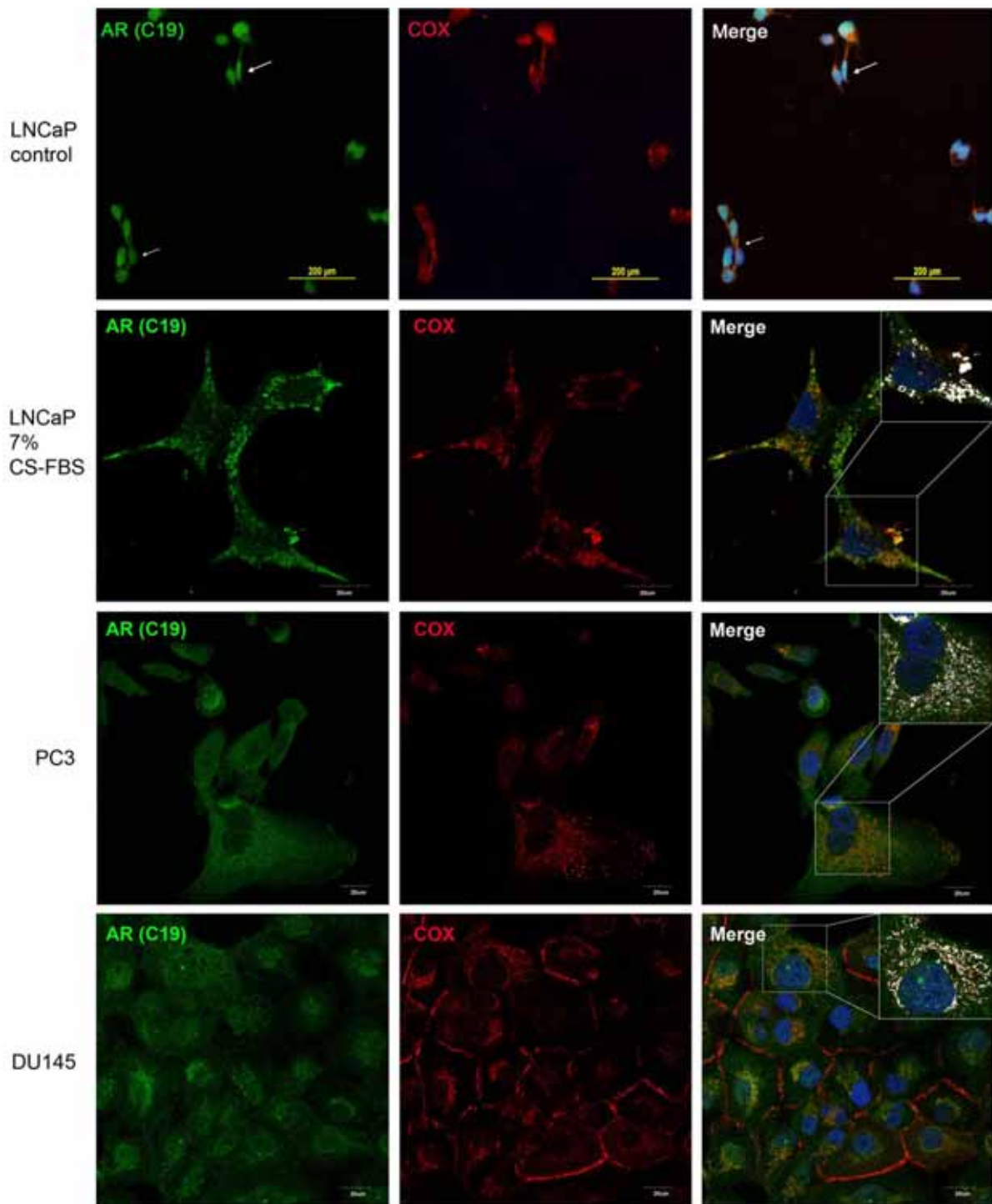
En canvi, en les LNCaP crescudes en condicions de supressió hormonal (7% *CS*-FBS; figura 84b), amb l'anticòs dirigit contra N-terminal vam obtenir un marcatge completament negatiu per l'AR, mentre que amb l'anticòs dirigit contra la part C-terminal el marcatge obtingut va ser únicament citoplasmàtic. Així doncs, en condicions de deprivació hormonal desapareixia la tinció clarament nuclear per AR. A més a més, degut al medi deprivat d'hormones, les LNCaP quedaven aturades en el cicle cel·lular i gairebé no es dividien, tal i com s'observa en la figura.



**Figura 84.** Tinció de la línia cel·lular LNCaP amb diferents anticossos dirigits contra AR (en vermell hi ha marcat l'anticòs dirigit a la part N-terminal del receptor i verd, l'anticòs contra la part C-terminal). La línia LNCaP es va mantenir en condicions control (a) i en deprivació hormonal (b).

#### **4.7.1 AR es localitza a la mitocòndria en línies de càncer de pròstata hormono-independents.**

El marcatge perinuclear d'AR va suggerir que la mitocòndria podria ser la localització que presentava l'AR en deprivació hormonal, per això es va fer una co-tinció amb l'anticòs que reconeix COX I (proteïna del complex IV de la cadena respiratòria mitocondrial). Primerament es va fer la ICF a les LNCaP crescudes al 10% FBS, on apreciem, en verd, la localització nuclear per l'AR (anti ARC19), i en vermell, la localització de COX I, és a dir, la mitocòndria. Al sobreposar les dues tincions diferencials amb el DAPI no vam observar cap colocalització (figura 85, primera línia). Si observàvem les LNCaP crescudes en supressió hormonal, tornàvem a tenir la tinció d'AR al citoplasma, que al sobreposar-la amb la tinció feta per COX I, ens donava clarament una colocalització del receptor amb COX I, a la mitocòndria (figura 85 segona línia). Per comprovar si aquest fenomen estava lligat amb l'hormonoresistència, es va fer la mateixa anàlisi amb dues línies cel·lulars hormono-independents: les PC3 i les DU145. Ambdues línies cel·lulars presentaven marcatge positiu per AR a mitocòndria, confirmat un altre cop per la colocalització d'aquest amb COX I (figura 85, línia 3 i 4).



**Figura 85.** Localització de l'AR en les LNCaP i en altres línies cel·lulars hormonoindependents. A la primera fila del panell observem la localització nuclear d'AR en les LNCaP control, mentre que en la segona fila (LNCaP crescudes en deprivació hormonal) s'aprecia com AR i COX I colocalitzen mostrant la presència d'AR en la mitocondria. En la fila 3 i 4 s'observa la tinció per AR en les línies cel·lulars no dependents d'andrògens PC3 i DU145.

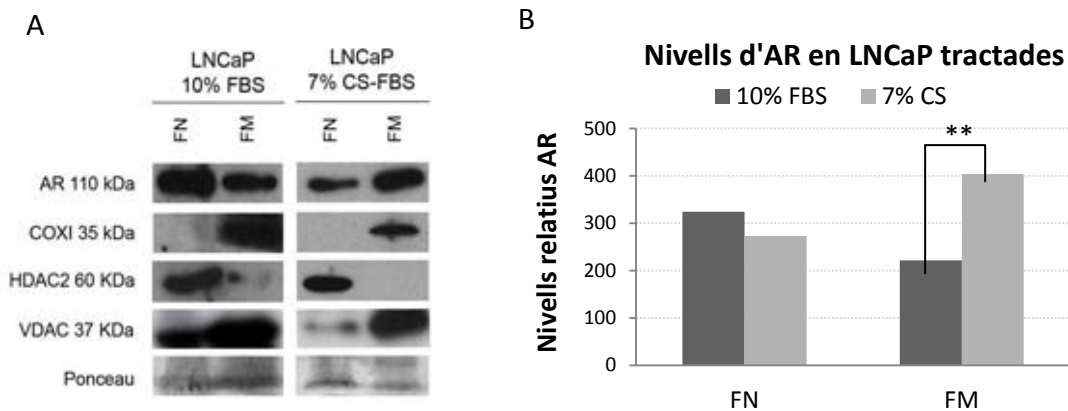
#### 4.7.2 La localització mitocondrial d'AR augmenta en LNCaP deprivades d'hormones

Per comprovar que la localització mitocondrial de l'AR estava augmentada en les cèl·lules crescudes al 7% *CS*-FBS, es van cultivar les LNCaP amb RPMI al 10% FBS i amb RPMI al 7% *CS*-FBS i es va fer el fraccionament cel·lular. Les diferents fraccions cel·lulars per a cada condició de creixement es van blotar amb anticossos contra l'AR, la COX I, VDAC [(Voltage-dependent anion channels), una porina mitocondrial localitzada a la membrana mitocondrial externa] i la HDAC2. Amb l'AR es va obtenir una banda de 110kDa tant en la fracció nuclear com mitocondrial d'ambdues condicions; tot i així, la banda era molt més intensa en la fracció mitocondrial de les LNCaP crescudes en *CS*-FBS (figura 86).

Per assegurar que l'augment de la localització d'AR a la fracció mitocondrial era causat pel tractament i no per potencials contaminacions d'altres subfraccions cel·lulars, es van utilitzar diferents anticossos per determinar la puresa de cada fracció. Així doncs, al blotar amb COX I detectarem una banda de 35KDa només en la fracció mitocondrial tant en cèl·lules tractades com no tractades. De manera similar, a l'utilitzar HDAC2, vam detectar la banda en la fracció nuclear tant de cèl·lules tractades com no tractades amb *CS*-FBS. No obstant, una lleugera banda en la fracció mitocondrial de les LNCaP control ens indicava una petita contaminació de nuclis en la fracció mitocondrial, que podria explicar major presència d'AR en la fracció mitocondrial de les LNCaP control (figura 86A i B).

A més a més, per comprovar si l'augment de la localització mitocondrial d'AR coincidia amb més biogènesi mitocondrial, es va incubar la membrana amb un anticòs contra VDAC. En la figura 86A es pot comprovar que la banda de 37 KDa per VDAC en les LNCaP control és menys intensa que la banda en les LNCaP 7% *CS*-FBS. Es suggereix, doncs, que en les cèl·lules crescudes en condicions de deprivació hormonal no hi ha una major biogènesi mitocondrial. Per tant, aquests resultats posen de manifest que en condicions de *CS*-FBS la localització d'AR canvia de nucli a la mitocòndria i que aquest canvi no és degut a un augment de la biogènesi mitocondrial.

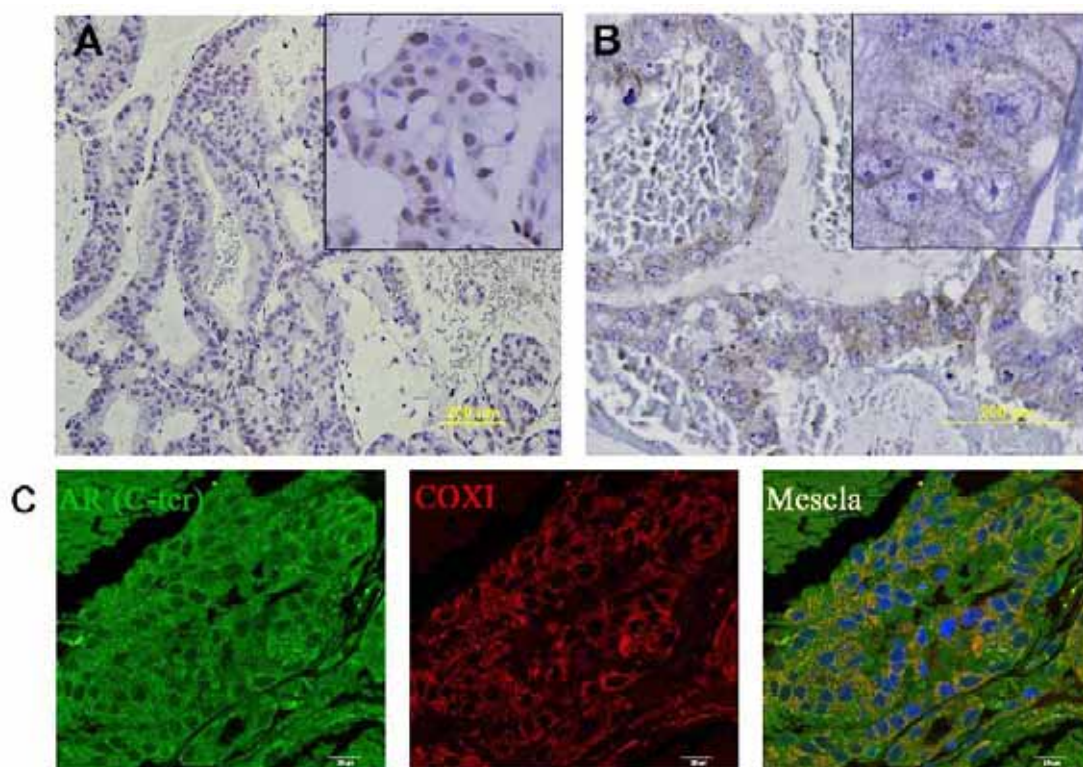




**Figura 86.** Translocació d'AR en les LNCaP. **A)** Anàlisi per *western blot* de l'expressió d'AR, COX I, HDAC2 i VDAC en la fracció nuclear (FN) i en la fracció mitocondrial (FM) en les LNCaP control (10% FBS) i en les tractades (7% CS-FBS). S'utilitzà el *Ponceau* com a control de càrrega del gel. **B)** Quantificació de l'expressió d'AR en la FN i en la FM per totes dues condicions de creixement del cultiu cel·lular. \*\*  $p < 0,01$ .

#### 4.8 LOCALITZACIÓ MITOCONDRIAL DE L'AR EN TUMORS PAC120 CASTRATS

Per tal de determinar si la variació de la localització d'AR es produïa de manera generalitzada en les cèl·lules epitelials tumorals de la pròstata, es van analitzar els tumors dels PAC120. En els ratolins sense castrar ( $n=4$ ), la tinció per l'AR amb el sistema DAB era clarament nuclear (figura 87A). En canvi, en els ratolins castrats químicament o quirúrgicament ( $n=4$ ) el marcatge per l'AR ja no era nuclear sinó que era un marcatge citoplasmàtic (figura 87B). Per tal de comprovar en quin orgànel cel·lular citoplasmàtic es trobava l'AR, tal i com es va fer amb les línies cel·lulars, es va fer la colocalització amb COX I mitjançant fluorescència. I tal i com passava en les línies amb deprivació hormonal, l'AR colocalitzà amb COX I, indicant que en els PAC120 castrats quirúrgicament l'AR patia un canvi en la localització cel·lular, translocant-se a la mitocondria en condicions de supressió hormonal (figura 87C).



**Figura 87.** Translocació d'AR del nucli a la mitocòndria en el model animal PAC120. **A)** tinció per AR C19 mitjançant IHQ i el mètode de revelat DAB en PAC 120 control. **B)** mateixa tinció que en **A**, però en un PAC120 castrat químicament. **C)** ICF amb marcatge per AR C19 (verd) i COX (en vermell) per comprovar la translocació d'AR de nucli a mitocòndria en PAC120 castrat.

#### 4.9 ANÀLISI *IN SILICO* D'AR PER DETERMINAR LA PRESENCIA DE SENYALS DE LOCALITZACIÓ MITOCONDRIALS.

Moltes de les proteïnes mitocondrials codificades pel DNA nuclear contenen un pèptid senyal en l'extrem aminoterminal (Bauer, Hofmann et al. 2000). Degut a la localització mitocondrial d'AR en les condicions de deprivació hormonal, vam iniciar una recerca *in silico* d'alguna senyal de localització mitocondrial amb l'ajuda d'alguns programes bioinformàtics (veure la taula 20). Tot i que en la literatura no està descrit cap pèptid senyal canònic per AR, com que Salakadi i col·laboradors van descriure en l'AR dues regions (en la part N-terminal i C-terminal) amb seqüències amb característiques similars a les seqüències internes de localització mitocondrial de dues proteïnes, BSC1 i Tim23p (Solakidi, Psarra et al. 2005), es van ampliar les nostres possibilitats. Utilitzant diferents programes de predicció vam trobar potencials pèptids senyal en la posició aminoterminal però amb baixa probabilitat d'importació a la mitocòndria. No obstant, un dels programes de predicció (ELM) va detectar

una possible senyal d'importació a mitocòndria en la seqüència d'aminoàcids de l'AR. A més, amb el programa TargetP 1.1 vam trobar una seqüència de 32 aminoàcids amb alta probabilitat d'import a la mitocòndria, però el programa no mostra ni la seqüència concreta ni on està localitzada. La seqüència d'AR utilitzada es va extreure del GeneBank (GenBank: AAA51772.1).

**Taula 20. Possibles pèptids senyal per a la localització mitocondrial del receptor d'andrògens.**

PROGRAMA	SEQÜÈNCIA (mTPS)	POSICIÓ	PROBABILITAT
PSORT II	YRGAF	19-23	8.7%
Ipsort	MEVQLGLGRVYPRPPSKTYRGAFQNLFQSV MEVQLGLGRVY- -P-RPPSKTYRGAFQNLFQSV	1-30	
MitoProt II	MEVQLGLGRVYPRP	1-15	28.9 %
TargetP 1.1	32 aa	Mit	65.0 %
ELM	RNDCTID	596-602	

#### 4.10 L'AR INTERACCIONA AMB LA SUBUNITAT IV DEL COMPLEX IV

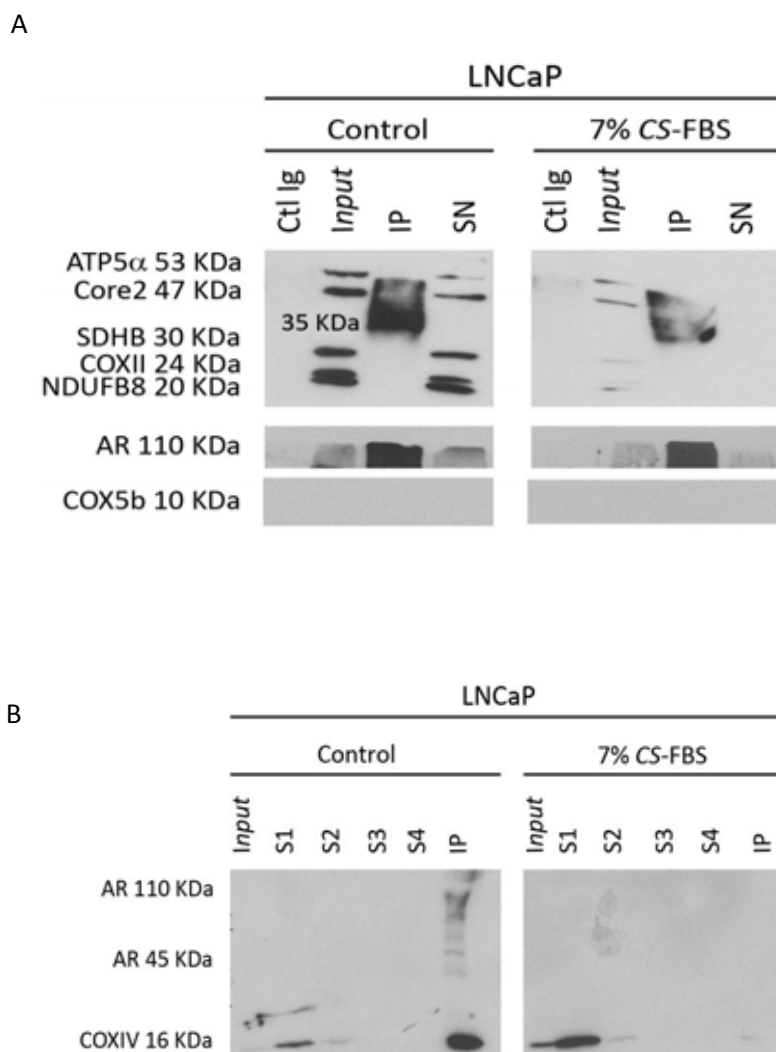
L'any 2001, Beauchemin i col·laboradors van publicar la interacció entre el receptor d'andrògens i la subunitat Vb de la citocrom c oxidasa. Per aquest motiu vam decidir fer estudis de possibles interaccions del receptor d'andrògens a mitocòndria. Per tal de determinar si l'AR estava unit a alguna de les proteïnes dels diferents complexos de la cadena respiratòria mitocondrial es va realitzar una immunoprecipitació en les LNCaP crescudes amb RPMI complementat amb el 10% de FBS o amb el 7% CS-FBS.

Es van portar a terme diferents diferents experiments en paral·lel, utilitzant només la fracció mitocondrial, per comprovar aquesta possible unió. En el primer experiment es va utilitzar un anticòs contra l'ARC19 per immunoprecipitar la proteïna endògena. Mitjançant *western blot* amb un còctel d'anticossos contra diferents subunitats dels complexos de la cadena respiratòria mitocondrial [NDUFB8 (complex I) de 20 KDa; SDHB (complex II) de 30 KDa; Core 2 (complex III) de 47 KDa; COX II (complex IV) de 24 KDa, i ATP5 $\alpha$  (complex V) de 53 KDa] i amb un anticòs contra la subunitat Vb (complex IV) de 10 KDa s'analitzà la possible interacció en les nostres condicions de creixement de la línia cel·lular LNCaP. Observant les bandes obtingudes en el *western blot* en les LNCaP crescudes en les condicions control vam veure que a l'utilitzar el còctel contra les diferents subunitats de la cadena respiratòria mitocondrial, en la fracció de l'immunoprecipitat apareixia una banda que no apareixia en la

fracció proteica no immunoprecipitada (*l'input*) ni tampoc en el sobrenedant (figura 88A). Aquesta banda no corresponia a cap de les subunitats de la cadena respiratòria ja que presentava una mida de 35 KDa aproximadament. Al blotar contra la subunitat Vb del complex IV no vam observar la banda de 10 KDa corresponent a aquesta subunitat. L'AR apareixia només en l'immunoprecipitat (figura 88A). En les LNCaP crescudes en deprivació hormonal apareixia una banda d'AR molt tènue en la fracció no immunoprecipitada i una banda molt més intensa en l'immunoprecipitat. Quan blotàvem contra el còctel d'anticossos que reconeixien les diferents subunitats de la citocrom c oxidasa, la banda de l'immunoprecipitat de 35 KDa no era tan clara com ho era en les condicions control; en les LNCaP crescudes al 7% CS-FBS tampoc es va detectar la banda pertanyent a la subunitat Vb del complex IV (figura 88A). Hauria estat molt interessant retallar aquesta banda i analitzar la seva seqüència a través de MALDI, però es va haver de finalitzar aquí el projecte.

En el segon experiment, i fet en paral·lel amb el primer, s'utilitzà un anticòs contra el complex IV mitocondrial per immunoprecipitar les proteïnes endògenes que formen part del complex, i mitjançant *western blot* amb anticossos contra l'AR i contra la subunitat IV (COX IV) del complex IV vam analitzar una possible interacció.

Es va incubar la membrana amb l'anticòs ARC19 i en les LNCaP control vam observar com apareixia banda tant en *l'input* com en la fracció de l'immunoprecipitat; a més a més, apareixia també la banda en el primer sobrenedant (figura 88B). A l'analitzar els resultats en les LNCaP crescudes al 7% CS-FBS vam observar que no hi havia banda per l'AR en l'immunoprecipitat però sí que n'hi havia en *l'input* i en el sobrenedant, sent aquesta banda molt intensa, i indicant que quelcom no havia funcionat en la tècnica (figura 88B). Per comprovar que sí havia funcionat la tècnica en les LNCaP control es va blotar la membrana contra la COX IV del complex IV i es va comprovar com hi havia, en l'immunoprecipitat, una banda molt intensa de 16 KDa de pes, que no hi era en les LNCaP crescudes a 7% CS-FBS (figura 88B), confirmant així que la tècnica no havia funcionat bé en aquestes condicions de tractament.



**Figura 88.** Immunoprecipitacions en les LNCaP. **A)** Immunoprecipitació d'AR en les LNCaP crescudes sense i amb deprivació hormonal (control i 7% CS-FBS, respectivament). **B)** Immunoprecipitació del complex IV de la cadena respiratòria.

#### 4.11 L'ANÀLISI DEL GENOMA MITOCONDRIAL HUMÀ MOSTRA POSSIBLES LLOCS D'UNIÓ I D'ACCIÓ DE LES HORMONES ESTEROÏDALS

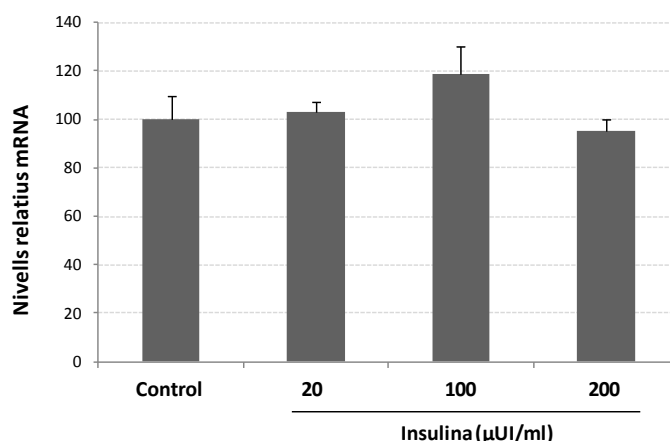
S'ha descrit en la literatura la presència de nombroses seqüències amb similaritat parcial a les seqüències consens per al lloc d'unió de les hormones o HREs en el DNA mitocondrial (Demonacos, Karayanni et al. 1996). Vam analitzar la seqüència completa del DNA mitocondrial i vam identificar diferents potencials llocs d'unió, especificats en la taula 21.

	<b>GGTACA</b>	<b>NNN</b>	<b>TGTTCT</b>	<b>HRE seqüència consens (ARE)</b>	
53	GGTATT	TTC	GTCTGG	67	
1362	GCTACA	TTT	TCTACC	1376	s-rRNA (RNR1)
2592	GGTAGC	ATA	ATCACT	2606	l-rRNA (RNR2)
5827	GGTAAA	AAG	AGGCCT	5841	tRNA-Tyr (TRNY)
6717	GGTATG	GTC	TGAGCT	6732	<i>cytochrome c oxidase subunit I</i> (COX I)
7852	GGTCAA	CGA	TCCCTC	7866	<i>cytochrome c oxidase subunit II</i> (COX II)
10406	GGTATA	TAG	TTTAAA	10420	tRNA-Arg (TRNR)
11482	GGTATA	ATA	CGCCTC	11497	<i>NADH dehydrogenase subunit 4</i> (ND4)
12622	GTTACA	TGG	TCCATC	12636	<i>NADH dehydrogenase subunit 5</i> (ND5)
13633	GGTCAA	CCT	CGCTTC	13647	<i>NADH dehydrogenase subunit 5</i> (ND5)
16129	GGTACC	ATA	AATACT	16143	

**Taula 21.** Possibles llocs d'unió i d'acció de les hormones esteroïdals en el DNA mitocondrial. Es marquen en gris els nucleòtids coincidents amb els nucleòtids de la seqüència consens.

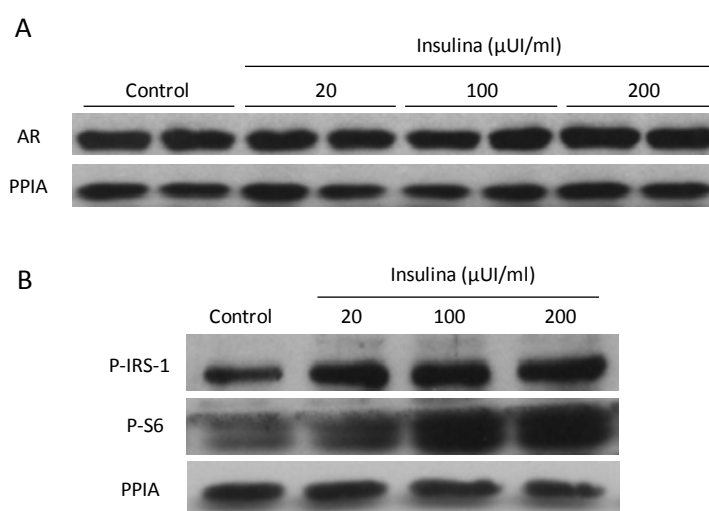
#### 4.12 EL TRACTAMENT AMB INSULINA NO AFECTA ELS NIVELLS D'AR EN LES LNCaP

Com que s'havia descrit que els pacients diabètics que utilitzava el tractament amb insulina tenia poc risc de patir càncer de pròstata (Velicer, Dublin et al. 2007), vam voler comprovar si la insulina tenia algun efecte sobre l'expressió del gen d'AR, tant a nivell de mRNA com de proteïna. Primerament es van analitzar els nivells de mRNA d'AR de les cèl·lules LNCaP tractades amb tres concentracions diferents d'insulina durant 4 dies i no es van observar canvis en els nivells de missatger del receptor en comparar-ho amb les LNCaP no tractades (figura 89).



**Figura 89.** Nivells relatius de mRNA d'AR en les LNCaP crescudes en diferents concentracions d'insulina i a 5 mM de D-glucosa. El gen ribosomal S18 humà s'ha utilitzat com a normalitzador en l'amplificació.

A continuació vam analitzar els nivells de proteïna d'AR i vam observar que aquests tampoc no varien entre les LNCaP crescudes en les diferents concentracions d'insulina i les no tractades (figura 90A). Per assegurar-nos de què el tractament amb insulina havia funcionat en la línia cel·lular de càncer de pròstata hormonodepenent es va determinar la fosforilació de les proteïnes IRS-1 i S6. Els resultats mostraven que el tractament amb insulina havia augmentat la fosforilació de totes dues proteïnes, sempre comparant-ho amb les LNCaP no tractades (figura 90B).

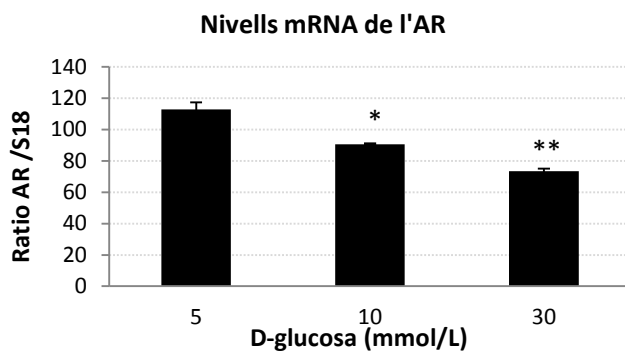


**Figura 90. A)** Anàlisi per *western blot* (*wb*) dels nivells de proteïna d'AR en presència de diferents concentracions d'insulina en la línia cel·lular LNCaP. **B)** Mesura per *wb* dels nivells de fosforilació de IRS-1 i S6 en les LNCaP tractades amb diferents concentracions d'insulina durant 4 dies. S'ha utilitzat PPIA com a gen normalitzador.

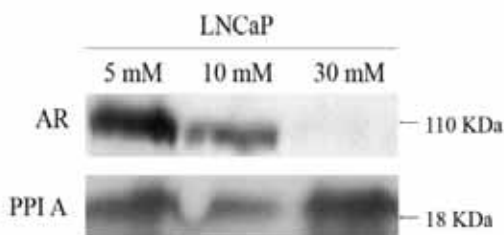
#### 4.13 L'AUGMENT DE CONCENTRACIÓ DE GLUCOSA DISMINUEIX EL NIVELL D'AR EN LNCaP

Es van fer experiments amb les LNCaP per estudiar els efectes de la hiperglicèmia en l'expressió del gen d'AR. Es van sembrar en diferents concentracions creixent de D-glucosa (5 mM, 10 mM i 30 mM) durant 5 dies, canviant el medi cada dia per mantenir constant la concentració de glucosa. Com s'observa, hi havia una major disminució tant dels nivells de mRNA (figura 91A) com de proteïna d'AR (figura 91B) a concentracions elevades de glucosa (30 mM de D-glucosa) mentre que la disminució a baixes concentracions (10 mM de D-glucosa) era inferior quan la comparàvem amb els nivells de mRNA i de proteïna de les LNCaP crescudes a 5 mM de D - glucosa (Figura 91A i B).

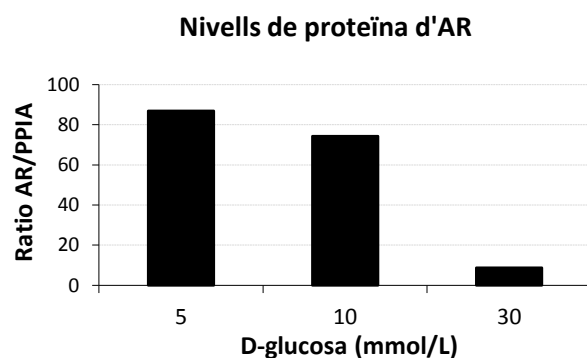
A



B



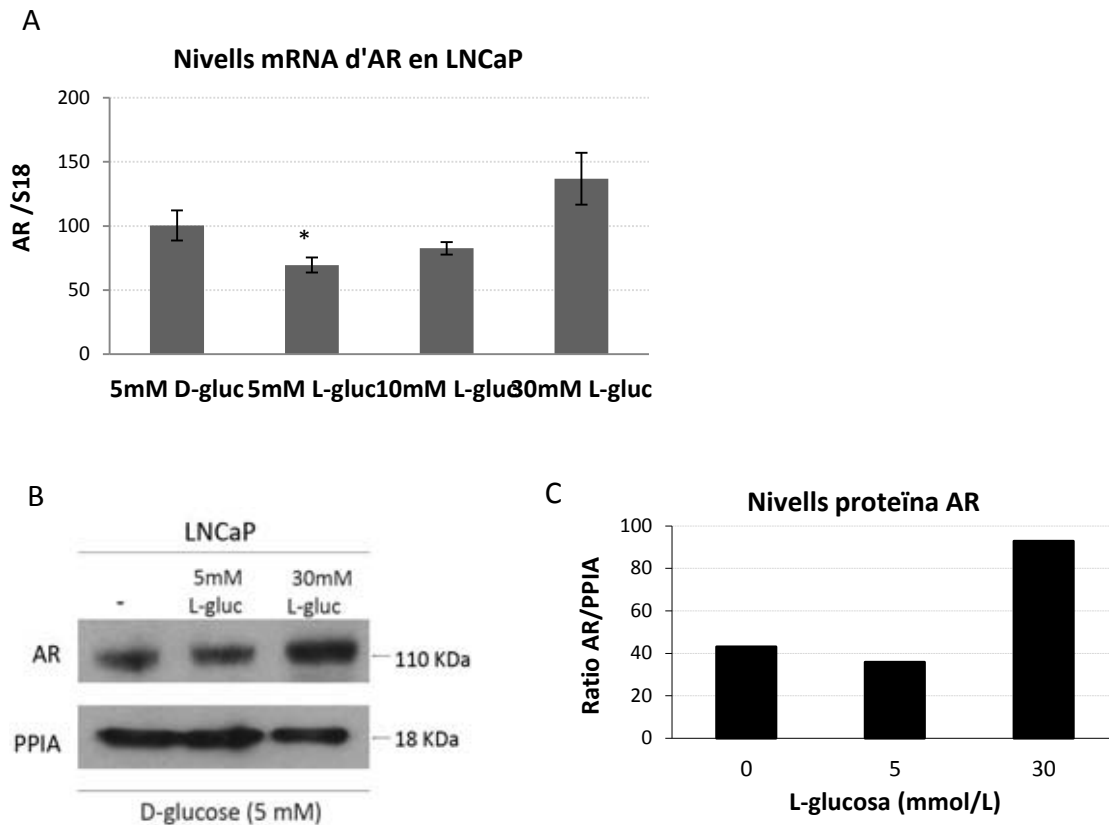
C



**Figura 91. A)** Nivells relatius de mRNA d'AR en les LNCaP crescudes en diferents concentracions de D-glucosa. El gen ribosomal S18 humà s'ha utilitzat com a normalitzador en l'amplificació. La barra indica la desviació estàndard corresponent a 3 experiments independents. \* $p < 0,05$  i \*\* $p < 0,01$  comparat amb 5 mM de D-glucosa. **B)** Anàlisi dels nivells de proteïna d'AR en les LNCaP crescudes en diferents concentracions de D-glucosa. PPIA s'ha utilitzat com a gen normalitzador.



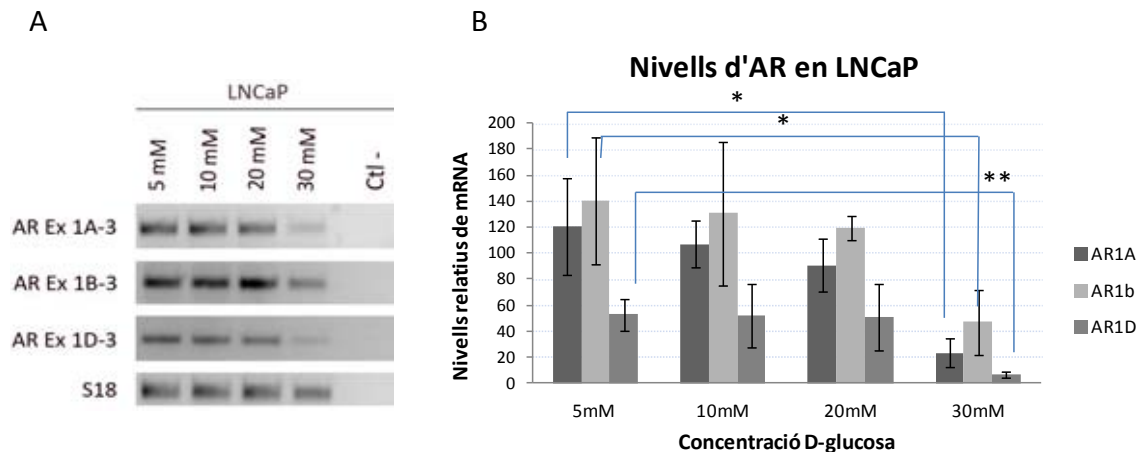
Per a descartar qualsevol efecte osmòtic provocat en el cultiu a l'augmentar la concentració de glucosa, es van repetir els experiments utilitzant L-glucosa. Els resultats indicaren que els nivells d'AR tant de mRNA (figura 92A) com de proteïna (figura 92B) augmentaven enlloc de disminuir en les LNCaP a 30 mM de L-glucosa al ser comparats amb els nivells de les cèl·lules crescudes a 10 mM de L-glucosa, descartant així que la disminució de l'AR fos deguda a un fenomen osmòtic.



**Figura 92. A)** Nivells relatius de mRNA d'AR en les LNCaP crescudes a 5 mM de D-glucosa i a concentracions creixents de L-glucosa durant 4 dies. El gen ribosomal S18 humà s'ha utilitzat com a normalitzador en l'amplificació. La barra indica la desviació estàndard corresponent a 3 experiments independents. \* $p < 0,05$  i \*\* $p < 0,01$  comparat amb 5 mM de D-glucosa. **B)** Nivells de proteïna d'AR mesurat per *wb* en LNCaP tractades en les mateixes condicions que en el panell superior. **C)** Quantificació dels nivells de proteïna d'AR. S'ha utilitzat PPIA com a gen normalitzador.

Com que en el grup s'havien descrit noves isoformes del receptor d'andrògens es va voler comprovar si alguna d'aquestes noves isoformes també es veia afectada per l'augment de la concentració de glucosa. Mitjançant PCR sq (figura 93A) es va observar que la hiperglicèmia provocava la disminució de l'expressió del mRNA d'AR en les tres isoformes (1A, 1B i 1D)

analitzades. Així doncs, per confirmar quantitativament aquests resultats es va realitzar una PCR quantitativa a temps real, i es va confirmar que a mesura que augmentava la concentració de D-glucosa en el medi de cultiu, els nivells de mRNA de les isoformes d'AR analitzades disminuïen, sobretot a 30 mM de D-glucosa (figura 93B).



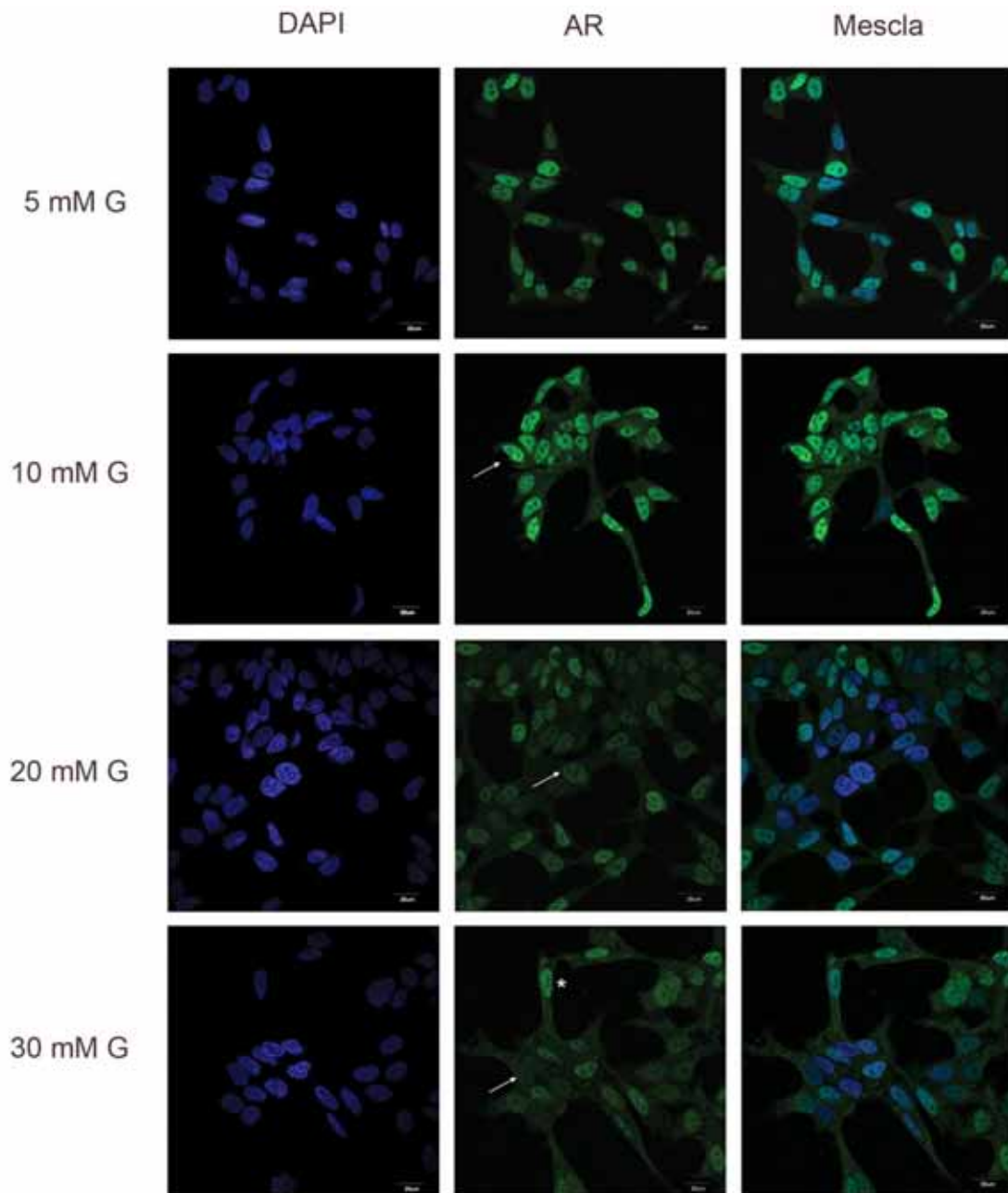
**Figura 93.** Anàlisi dels nivells de mRNA d'AR en les LNCaP mitjançant PCR sq (A) i quantitativa (B) crescudes a 5, 10, 20 i 30 mM de D-glucosa. El gen ribosomal S18 humà s'ha utilitzat com a gen normalitzador de la quantificació. La barra indica la desviació estàndard corresponent a 3 experiments independents. \* $p < 0,05$  i \*\* $p < 0,01$  comparat amb 5 mM de D-glucosa.

#### 4.14 DETECCIÓ DE LA DISMINUCIÓ DEL MARCATGE NUCLEAR D'AR EN AUGMENTAR LA CONCENTRACIÓ DE GLUCOSA

Es va fer immunocitofluorescència a les LNCaP crescudes a les diferents concentracions de glucosa per tal d'observar si hi havia un canvi en la localització cel·lular de l'AR, si hi havia una disminució de la intensitat del senyal i a quina concentració de glucosa es produïen aquests possibles canvis.

Vam observar que la tinció d'AR era positiva i clarament nuclear en les LNCaP crescudes a 5 i 10 mM de D-glucosa (figura 94, fila 1 i 2). En les cèl·lules crescudes a 20 mM de D-glucosa vam observar com hi havia nuclis on s'apreciava la tinció positiva per l'AR, però en d'altres nuclis aquesta tinció no hi era o era una tinció molt més dèbil (figura 94, fila 3). A les crescudes a 30 mM de D-glucosa vam observar molt pocs nuclis amb tinció positiva per l'AR (marcat amb asterisc) ja que la gran majoria no presentaven tinció per AR en el nucli (figura

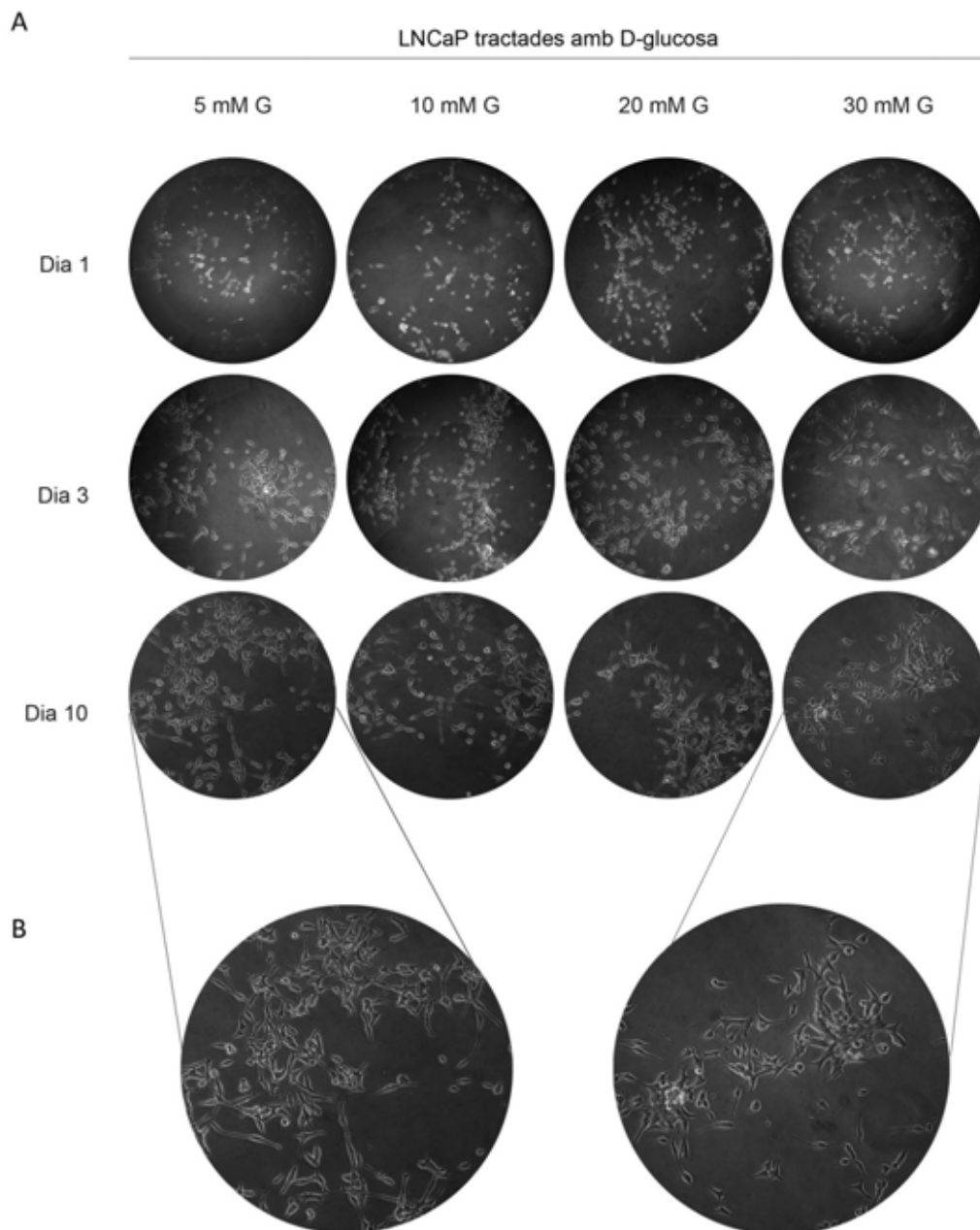
94, fila 4). Tant en les LNCaP crescudes a 20 com a 30 mM de D-glucosa no semblava que hi hagués un canvi en la localització d'AR, amb la qual cosa podem dir que la hiperglicèmia silencia l'AR però no en provoca una translocalització. S'ha utilitzat la tinció nuclear amb el colorant DAPI en totes les condicions per determinar si la tinció d'AR era o no nuclear.



**Figura 94.** Detecció de l'expressió d'AR per immunocitofluorescència en LNCaP crescudes a diferents concentracions de D-glucosa durant 5 dies. S'observa la disminució del marcatge de l'AR nuclear (en verd) en 20 i 30 mM de D-glucosa comparat amb 10 mM (fletxa blanca), quedant algun nucli positiu (asterisc blanc).

#### **4.15 EL TRACTAMENT AMB DIFERENTS CONCENTRACIONS DE GLUCOSA NO VARIA LA MORFOLOGIA DE LES LNCaP**

Per assegurar-nos que els canvis en els nivells de l'AR no eren deguts a una transició de les LNCaP cap a fibroblast o una diferenciació neuroendocrina, es van mantenir les LNCaP durant 10 dies en cultiu, creixent-les a diferents concentració de D-glucosa. Tal i com es pot observar en les fotografies de la figura 95, durant els dies de tractament i en totes les condicions de creixement no hi ha hagut cap canvi en les LNCaP ni en morfologia ni en nombre total de cèl·lules al cultiu. Per tant, la reducció en l'expressió de l'AR tant a nivell de mRNA i de proteïna no és deguda a cap canvi morfològic associat a processos de mort cel·lular (apoptosi, necrosi) ni d'aturada en el cicle cel·lular, sinó a la hiperglicèmia pròpiament.

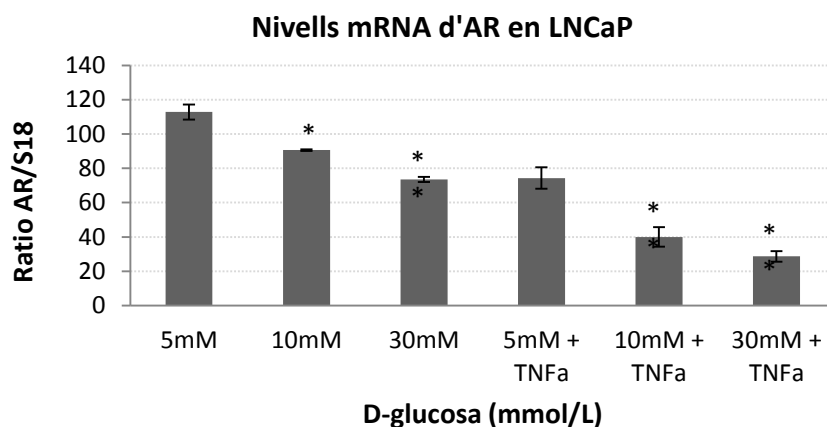


**Figura 95. A)** Fotografies de les condicions control i hiperglicèmia en diferents dies. **B)** Imatges augmentades 100 cops (100x) del desè dia de les LNCaP crescudes a 5 i 30 mM de D-glucosa.

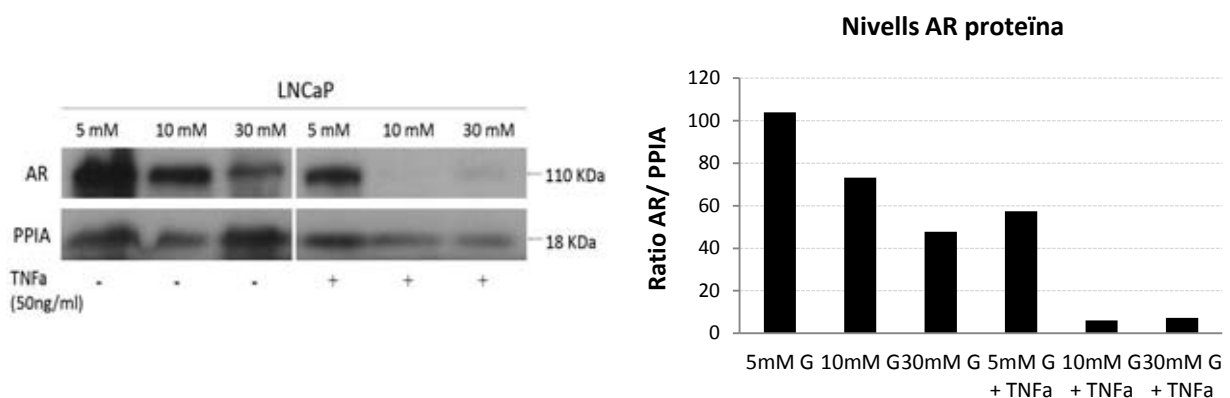
#### 4.16 SINÈRGIA D'ALTES CONCENTRACIONS DE GLUCOSA I TNF- $\alpha$ EN LA DISMINUCIÓ DE L'EXPRESSION D'AR EN LA LÍNIA CEL·LULAR LNCaP

Una de les característiques dels pacients diabètics és presentar un cert estat d'inflamació de baix grau juntament amb uns nivells de TNF $\alpha$  elevats en sang (Ko et al., 2008). Per això vam voler comprovar quin efecte podria tenir l'addició de TNF $\alpha$  en el nostre sistema *in vitro*. Per

això es van tractar les LNCaP amb concentracions creixents de D-glucosa (5mM, 10mM i 30mM) en presència o absència de TNF $\alpha$  (50ng/ml). Tant els nivells de mRNA (figura 96) com els de proteïna (figura 97) es van reduir significativament ( $p < 0,01$ ) en les condicions de 10 i 30 mM de D-glucosa en comparació amb les LNCaP tractades amb 5mM de D-glucosa. Els nivells de mRNA i proteïna d'AR encara es reduïen més si hi havia cotractament amb TNF $\alpha$  (Figura 96 i 97, respectivament).



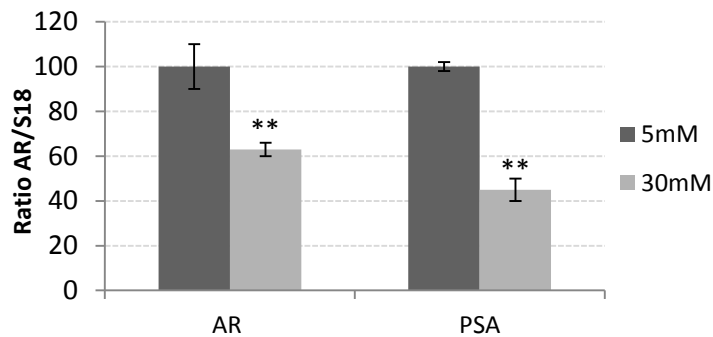
**Figura 96.** Nivells relatius de mRNA d'AR en les LNCaP crescudes en diferents concentracions de D-glucosa en presència o absència de TNF $\alpha$ . El gen ribosomal S18 humà s'ha utilitzat com a gen normalitzador de la quantificació. La barra indica la desviació estàndard corresponent a 3 experiments independents. \* $p < 0,05$  i \*\* $p < 0,01$  comparat amb 5 mM de D-glucosa.



**Figura 97.** Anàlisi dels nivells de proteïna d'AR en les LNCaP crescudes en diferents concentracions de D-glucosa (G) en presència o absència de TNF $\alpha$ . PPIA s'ha utilitzat com a gen normalitzador.

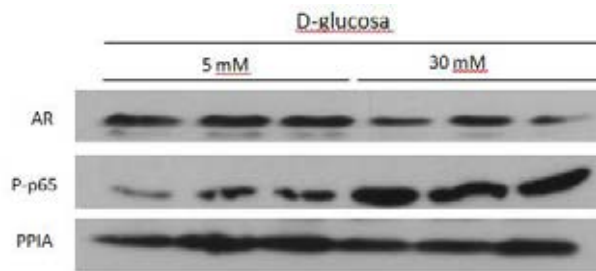
#### 4.17 LA HIPERGLICÈMIA REDUEIX ELS NIVELLS D'AR A TRAVÉS DE L'ACTIVACIÓ DE NF-κB EN LES LNCaP

Per comprovar si la hiperglicèmia era capaç de disminuir l'expressió d'AR a través de l'activació de la via NF-κB es va tornar a mesurar el mRNA d'AR en les LNCaP crescudes a 5 i 30 mM de D-glucosa durant 4 dies. Primer es van mesurar els nivells de mRNA del PSA, un gen depenent d'andrògens i regulat per l'AR. Amb el creixement de les LNCaP a 30 mM de D-glucosa vam obtenir una disminució dels nivells de mRNA tant per l'AR com pel PSA, al comparar-ho amb 5 mM de D-glucosa (figura 98).

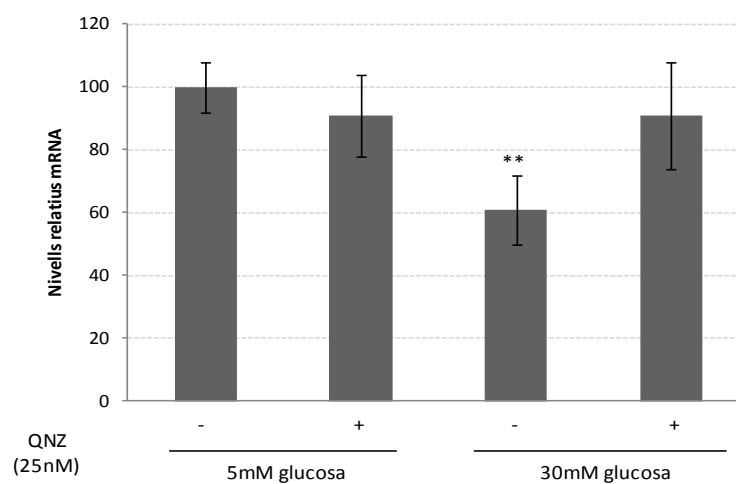


**Figura 98.** Nivells relatius de mRNA d'AR i PSA en les LNCaP crescudes a 5 i 30 mM de D-glucosa. El gen ribosomal S18 humà s'ha utilitzat com a gen normalitzador de la quantificació. La barra indica la desviació estàndard corresponent a 3 experiments independents. \* $p < 0,05$  i \*\* $p < 0,01$  comparat amb 5 mM de D-glucosa.

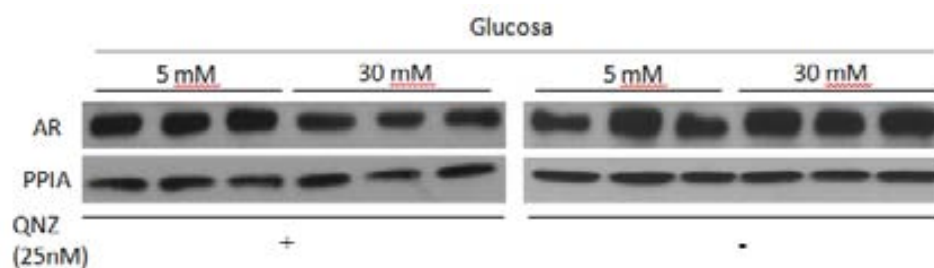
Els nivells de proteïna d'AR (110 KDa) també disminuïen en les LNCaP crescudes a 30 mM de D-glucosa en comparació amb aquelles crescudes a 5 mM. Després vam observar un augment en la fosforilació de p65 en les LNCaP crescudes a 30 mM de D-glucosa comparant-la amb les crescudes a 5 mM, indicant així l'activació de NF-κB (figura 99). Al tractar les LNCaP crescudes a 5 i 30 mM de D-glucosa amb presència o absència de QNZ vam observar que el cotractament hiperglicèmia més QNZ era capaç de bloquejar la disminució dels nivells de mRNA (figura 100) i de proteïna de l'AR que es produïa en les condicions de només hiperglicèmia (figura 101).



**Figura 99.** Anàlisi dels nivells de proteïna d'AR i p-P65 en les LNCaP crescudes a 5 i 30 mM de D-glucosa. PPIA s'ha utilitzat com a gen normalitzador.



**Figura 100.** Anàlisi dels nivells de mRNA d'AR en les LNCaP crescudes a 5 i 30 mM de D-glucosa en presència o absència de QNZ. El gen ribosomal S18 humà s'ha utilitzat com a gen normalitzador de la quantificació. La barra indica la desviació estàndard corresponent a 3 experiments independents. \*\* $p < 0,01$  comparat amb 5 mM de D-glucosa.



**Figura 101.** Anàlisi dels nivells de proteïna d'AR en les LNCaP crescudes a 5 i 30 mM de D-glucosa en presència o absència de QNZ. PPIA s'ha utilitzat com a gen normalitzador.

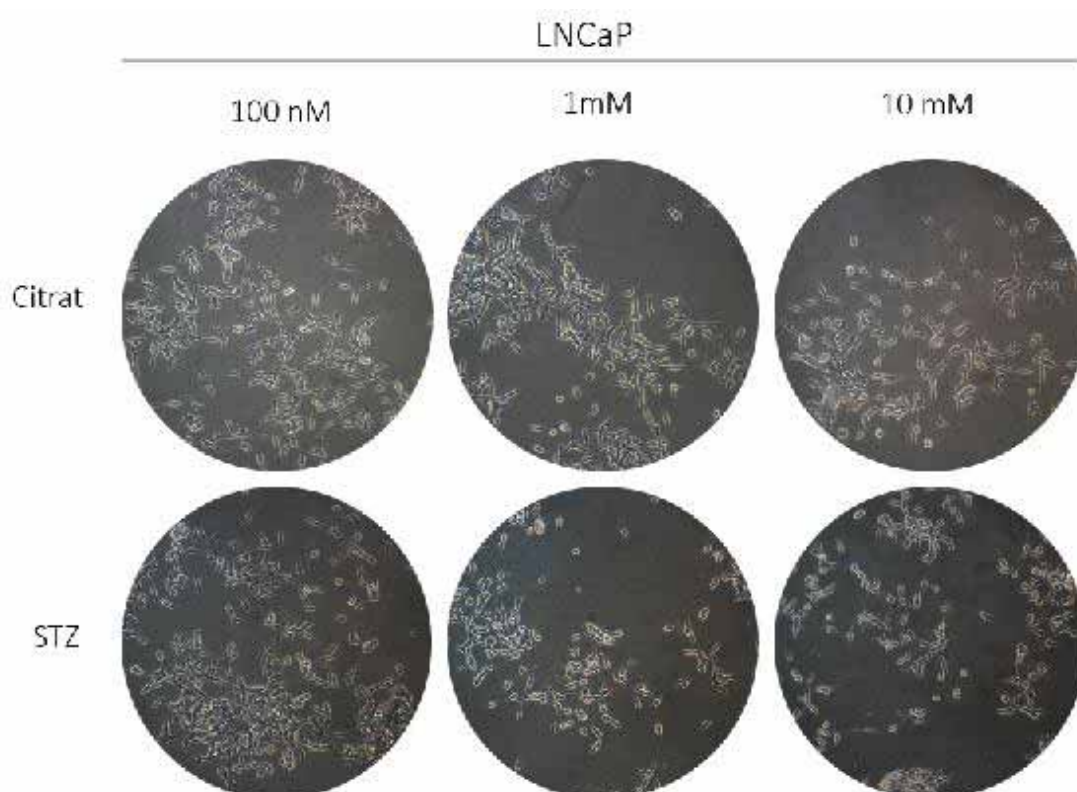


## 4.18 EL TRACTAMENT AMB STZ I CITRAT NO ÉS TÒXIC EN LES CÈL·LULES EPITELIALS LNCaP

Degut a la toxicitat de la STZ descrita per a les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques (Schnedl, Ferber et al. 1994), vam voler comprovar si es produïa aquest efecte en les cèl·lules epitelials abans de procedir a utilitzar el model *in vivo*. Per fer-ho es van utilitzar la línia cel·lular LNCaP.

### 4.18.1 No canvia la morfologia ni el nombre cel·lular

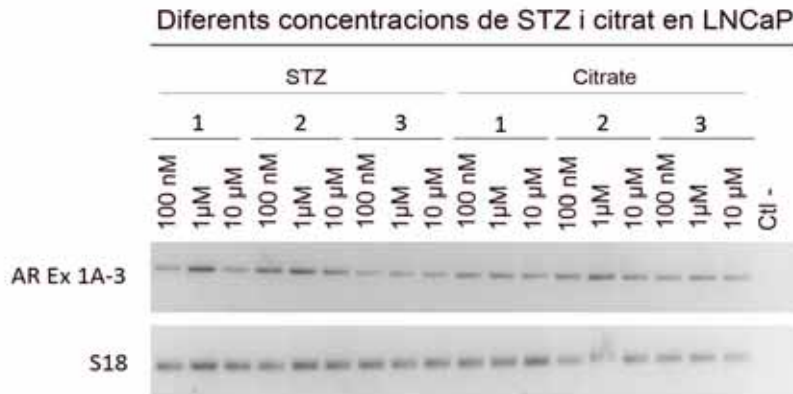
Les LNCaP es van créixer en diferents concentracions de STZ i amb tampó citrat 50 mM, pH 4,5 (el vehicle de la STZ) durant 5 dies. Es van fer fotografies diàries de les LNCaP i es va comprovar que no hi havia canvis en la morfologia epitelial ni tampoc una disminució en el nombre total de cèl·lules. Així doncs, la STZ i el citrat en la línia epitelial de càncer de pròstata LNCaP no induïa apoptosi ni toxicitat (figura 102).



**Figura 102.** Estudi de la toxicitat de la STZ en les LNCaP crescudes a 5 mM de D-glucosa durant 5 dies. Fotografies a 100 augments (100x) de les LNCaP tractades amb STZ i citrat a 100 nM, 1  $\mu$ M i 10  $\mu$ M.

#### 4.18.2 No disminueix els nivells de mRNA de l'AR

A continuació vam voler comprovar que el tractament amb STZ no tenia efectes tòxics sobre el cultiu així com tampoc produïa, per si sol, la disminució dels nivells de mRNA del receptor d'andrògens. Per fer-ho es va realitzar una PCR semi quantitativa utilitzant encebadors que reconeixien l'AR (figura 103).

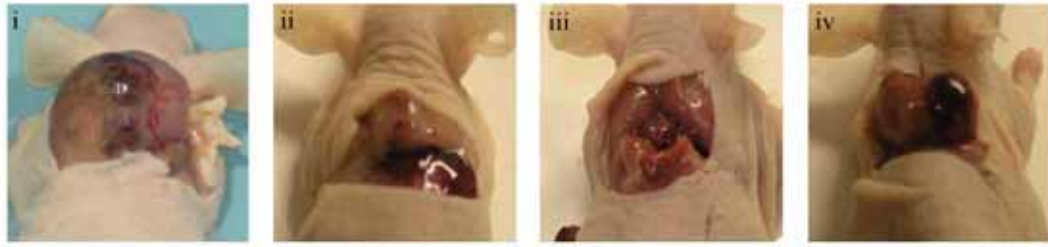


**Figura 103.** Anàlisi mitjançant PCR sq dels nivells de mRNA d'AR en cèl·lules LNCaP crescudes a 5 mM de D-glucosa i tractades amb citrat o STZ a 100 nM, 1 µM i 10 µM. El gen ribosomal S18 humà s'ha utilitzat com a gen normalitzador de la quantificació. S'han realitzat 3 experiments independents per a cada condició.

#### 4.19 LA DIABETIS INDUÏDA AMB STZ PRODUEIX UN RETARD EN EL CREIXEMENT DE TUMOR DE PRÒSTATA EN EL MODEL ANIMAL PAC120

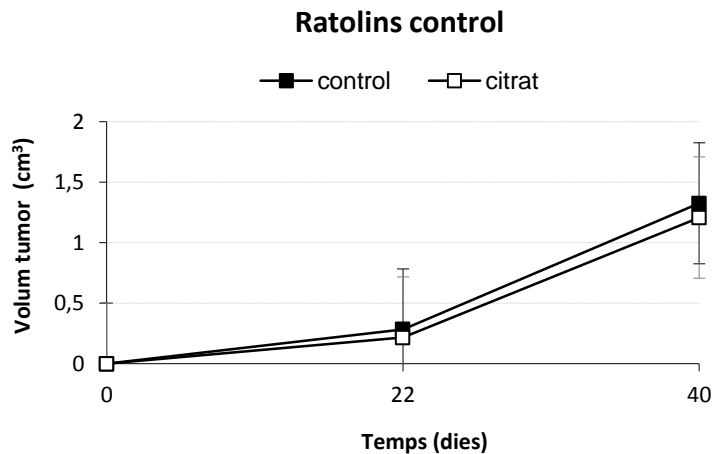
Es va induir la diabetis als ratolins nusos abans (n=7) i després (n=7) de la implantació subcutània del tumor de pròstata PAC120. Es va considerar també un grup d'animals com a grup control (amb tumor implantat però no tractats, (n=5)) i un grup d'animals amb tumor implantat i tractat amb citrat (n=5), el vehicle de la STZ.

Tant els animals control com els ratolins tractats amb citrat mostraven un creixement tumoral similar (Figura 104i) mentre que els ratolins als quals se'ls hi havia induït la diabetis mostraven un creixement molt reduït (figura 104ii) o nul del tumor (28,57% dels animals) (Figura 104iii). En aquests últims, un subgrup d'animals (28,57%) va mostrar poc creixement del tumor, i aquest creixement es donava en dos lòbuls connectats i encapsulats de manera conjunta (Figura 104iv).



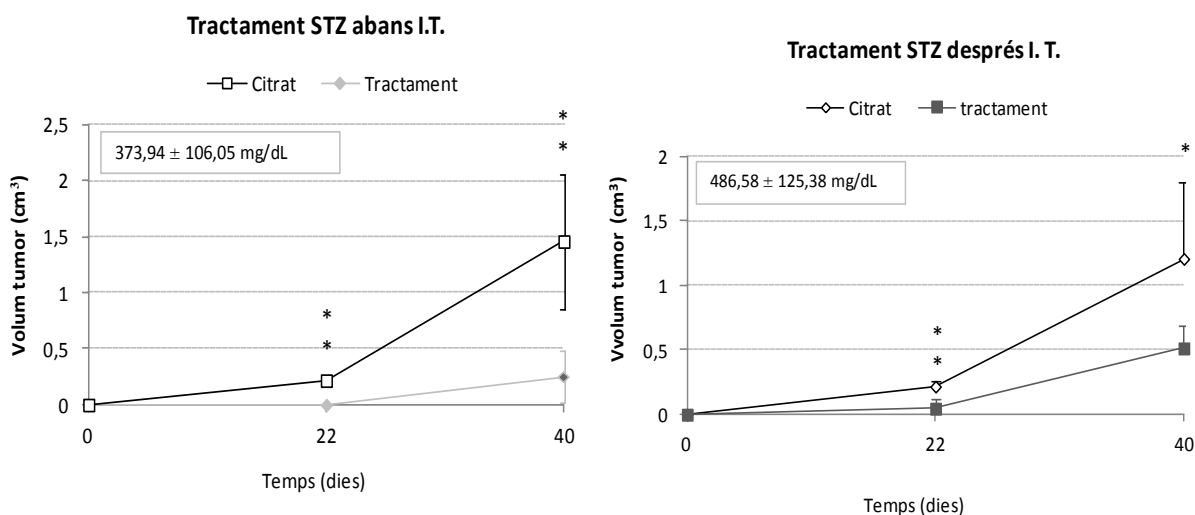
**Figura 104.** Fotografies dels tumors dels ratolins tractats amb citrat (i; n=5), i amb STZ, abans i després de la implantació (ii,iii, iv; n=7 per ambdós grups).

El seguiment del creixement del tumor es va fer mitjançant una mesura setmanal. Els animals no tractats i els tractats amb citrat van mostrar un comportament similar en el creixement del tumor durant els 40 dies de l'experiment (figura 105).



**Figura 105.** Gràfic on es mostra la comparació del volum del tumor entre animals no tractats o control (n=5) i tractats amb citrat (n=5).

Ambdós grups d'animals diabètics mostraven un creixement tumoral reduït quan els vam comparar amb els grups controls (figura 106). Fins i tot, els ratolins als quals se'ls hi havia induït la diabetis abans de la implantació del tumor (figura 106, panell esquerra) mostraven encara una reducció major en el volum tumoral que els animals on la diabetis es va induir després de la implantació del tumor (figura 106, panell dret).



**Figura 106.** Gràfics on es mostra el volum del tumor dels ratolins tractats amb STZ abans de la implantació del tumor (n= 7; gràfic esquerra) i després (n=7; gràfic dret) respecte el volum del tumor dels ratolins tractats amb citrat (n=5). La barra indica la desviació estàndard. \*p<0,05 i \*\*p<0,01 comparat amb 5 mM de D-glucosa. I. T.= implantació tumoral.

Els nivells de glucosa de tots els ratolins es van mesurar un cop per setmana i es va detectar un augment de la glicèmia en els ratolins tractats amb STZ respecte dels controls (taula 22).

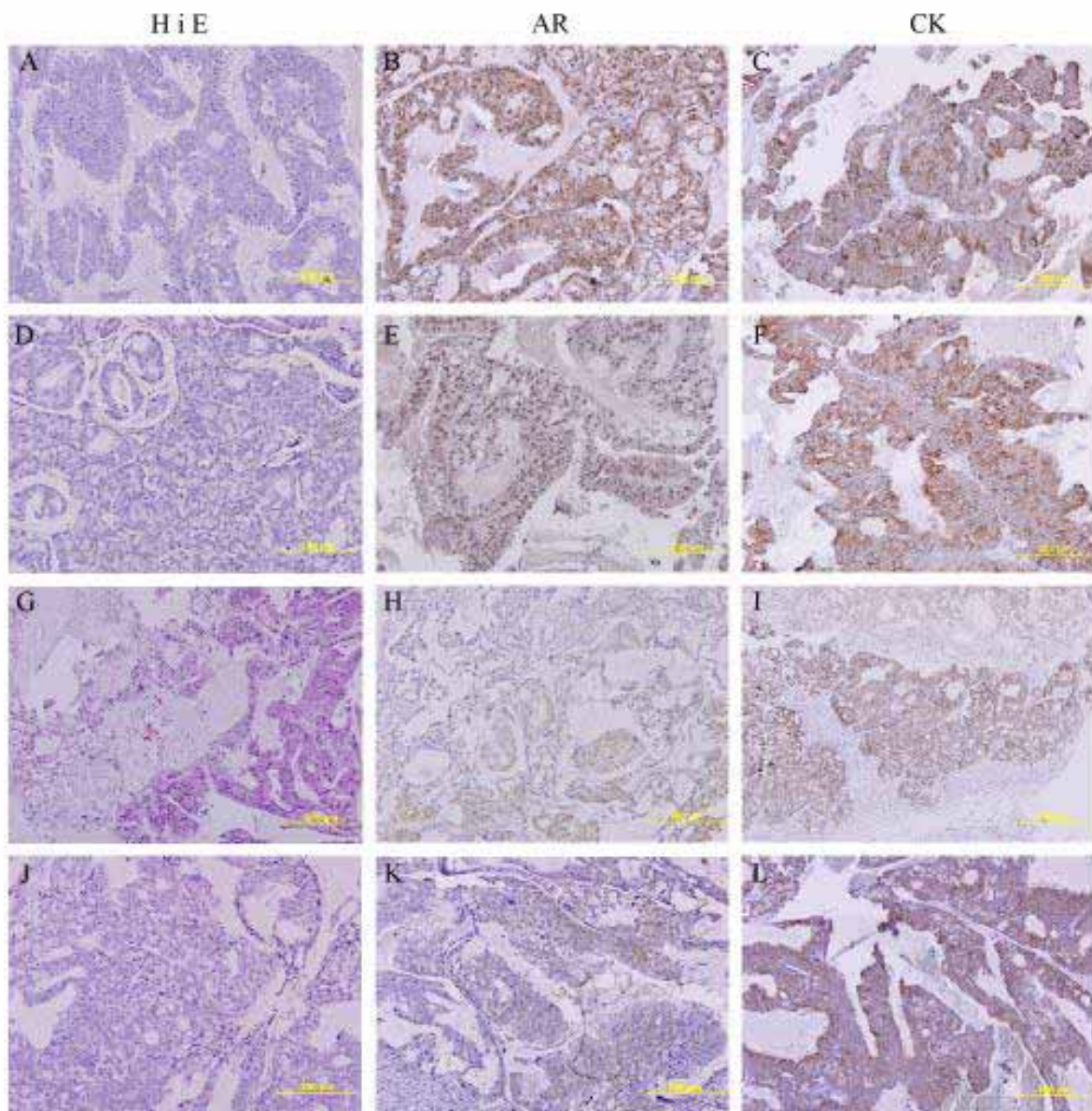
	CONTROL (N=5)	STZ ABANS I.T. (N=7)	STZ DESPRÉS I.T. (N=7)
PES INICIAL, g	32,04 ± 1,34	26,57 ± 2,26	28,62 ± 2,07
PES FINAL, g	33,04 ± 2,20	28,15 ± 2,05	30,5 ± 2,20
VOLUM TUMOR, cm <sup>3</sup>	1,21 ± 0,60	0,25 ± 0,22	0,49 ± 0,17
GLICÈMIA, mg/dL	133 ± 5,56	373,94 ± 106,05	486,58 ± 125,38

**Taula 22.** Recull de les dades referents al pes, al volum del tumor i als nivells de glucosa en sang per a cada grup d'animals. Les dades estan representades com a mitjana ± SD.

#### 4.20 LA DIABETIS INDUÏDA PER STZ PRODUEIX UNA REDUCCIÓ DEL MARCATGE DE L'AR EN ELS TUMORS I EN LES PRÒSTATES ENDÒGENES

L'examen histològic de les seccions del tumor de pròstata tenyides amb hematoxilina i eosina (H i E) no mostrava canvis entre la morfologia tumoral dels animals control (figura 107A) dels tractats amb el citrat (figura 107D) i la dels dos grups d'animals on s'ha induït la

diabetis (figura 107G i J). Aquests tumors presentaven una diferenciació glandular, un alt índex mitòtic i es van classificar amb un *Gleason* de 9 (4 + 5) pel patòleg.

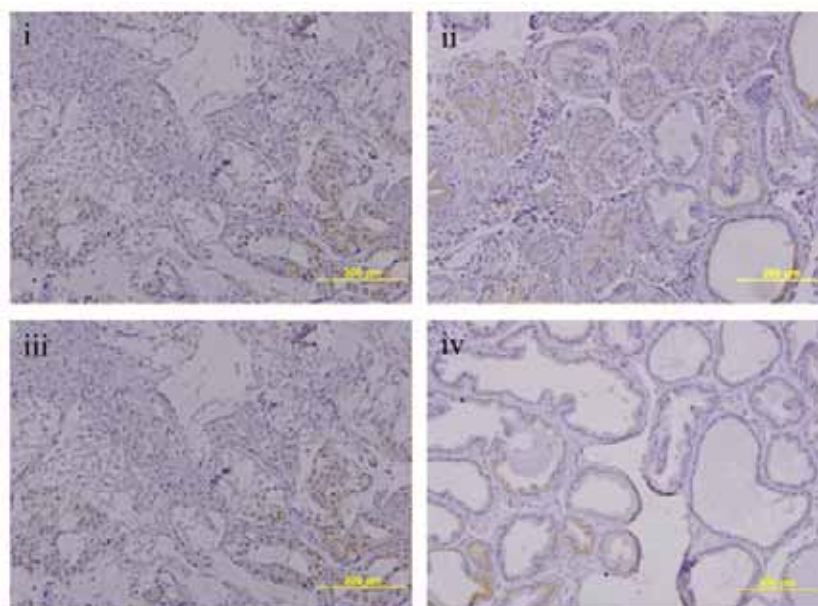


**Figura 107.** Tinció amb hematoxilina i eosina (H i E), immunohistoquímica pel receptor d'andrògens (AR) i citoqueratina (CK) en seccions de tumor d'animals control (A, B i C, respectivament), tractats amb citrat (D, E i F, respectivament), tractats amb STZ abans de la implantació del tumor (G, H i I, respectivament) i després de la implantació del tumor (J, K i L, respectivament).

Com que els experiments *in vitro* amb les LNCaP van mostrar que la hiperglicèmia reduïda els nivells de mRNA i de proteïna de l'AR, vam voler estudiar si la hiperglicèmia induïda en

els ratolins també els hi provocava una disminució dels nivells d'AR tant en el tumor com en la pròstata endògena. Per a elucidar-ho vam realitzar una immunohistoquímica marcant l'AR tant dels tumors dels animals control com dels tumors dels animals amb la diabetis induïda (abans o després del tractament amb STZ). El tumor dels animals control i tractats amb citrat (figura 107B i E, respectivament) mostraven una tinció positiva i clarament nuclear per AR en les cèl·lules epitelials mentre que els tumors dels animals diabètics (figura 107H i K) mostraven molt poques cèl·lules epitelials positives per AR a nucli o a citoplasma, tot i que la gran majoria no mostraven tinció per l'AR. La tinció positiva amb pan-citoqueratina (CK), un marcador específic de cèl·lules epitelials, confirmava que les cèl·lules tumorals tant amb marcatge positiu com negatiu per l'AR eren epitelials [animals control (figura 107C), animals tractats amb citrat (figura 107F) i animals diabètics (figura 107I i L)].

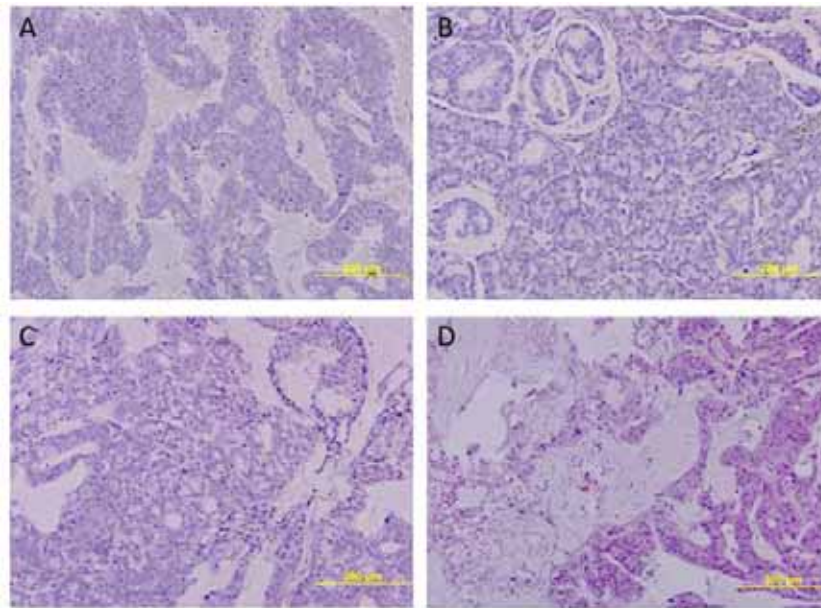
Seguidament, mitjançant immunohistoquímica contra la proteïna d'AR vam tenyir les pròstates endògenes tant dels animals tractats amb citrat (figura 108ii) com dels tractats amb STZ abans o després de la implantació tumoral (figura 108iv) per comprovar que la hiperglicèmia disminuïa també els nivells endògens d'AR. A l'observar les tincions per AR dels talls de les pròstates endògenes (figura 108ii i iv) vam comprovar com el marcatge positiu d'AR en les pròstates dels animals diabètics (figura 108iv) era molt inferior al comparar-lo amb el marcatge d'AR en les pròstates dels animals control (figura 108ii).



**Figura 108.** Immunohistoquímica pel receptor d'andrògens en seccions de tumor i pròstata endògena d'animals control (i i ii, respectivament) i seccions de tumor i pròstata d'animals tractats amb STZ (iii i iv, respectivament).

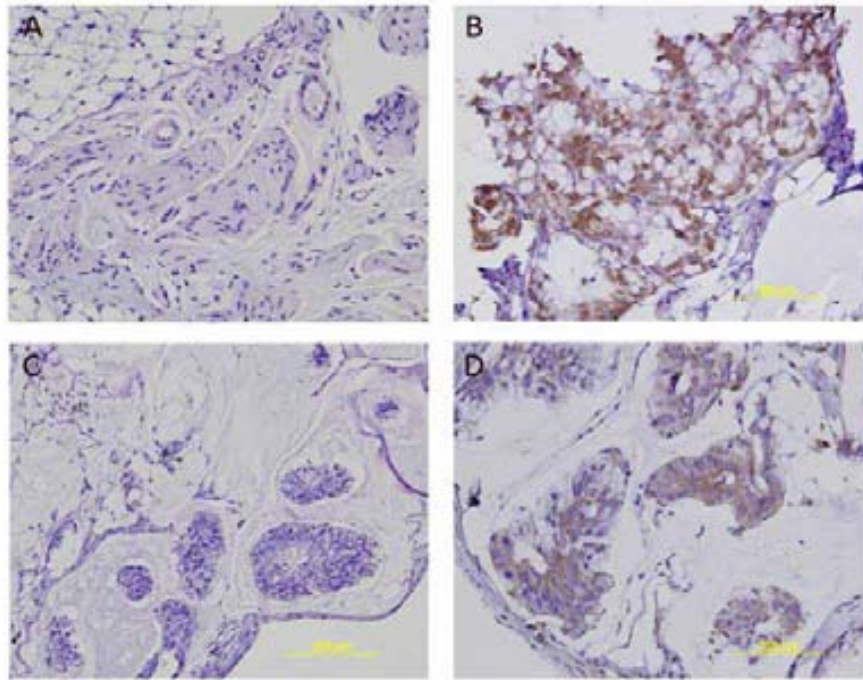
#### 4.21 LA DIABETIS INDUÏDA PER STZ PRODUEIX NECROSI EN EL TUMOR

L'anàlisi histològica dels animals tractats amb citrat (figura 109B) no mostra canvis morfològics respecte els tumors dels animals no tractats (figura 109A) en les seccions tenyides amb hematoxilina i eosina (H i E). Les seccions tenyides amb H i E dels animals amb diabetis induïda abans i després de la implantació del tumor (109C i 109D, respectivament) mostren nivells de necrosi en la part central del tumor.



**Figura 109.** Tinció amb hematoxilina i eosina (H i E) dels talls de tumors d'animals control (A), tractats amb citrat (B) i amb STZ abans i després de la implantació del tumor (C i D, respectivament).

Per comprovar quan es produïa aquesta necrosi, es van fer diabètics un grup d'animals (n=7) abans d'implantar-los-hi el tumor (I.T.). Es va implantar el tumor i al cap d'una setmana es van sacrificar. El que es va observar en les tincions H i E per als animals tractats amb citrat (figura 110A) i amb STZ 7 dies (figura 110C) era gairebé l'absència de cèl·lules epitelials tumorals, i al fer la tinció contra l'AR es va observar que aquestes presentaven una tinció nuclear negativa per l'AR en els animals tractats amb STZ 7 dies (figura 110D) mentre que en els tractats amb citrat (figura 110B) presentaven una tinció positiva i nuclear per AR. Així doncs, el procés de necrosi degut a la hiperglicèmia es dona des del principi de l'aparició del tumor, quan els animals eren diabètics abans de tenir el tumor implantat, tot i que el tumor creixi mínimament.

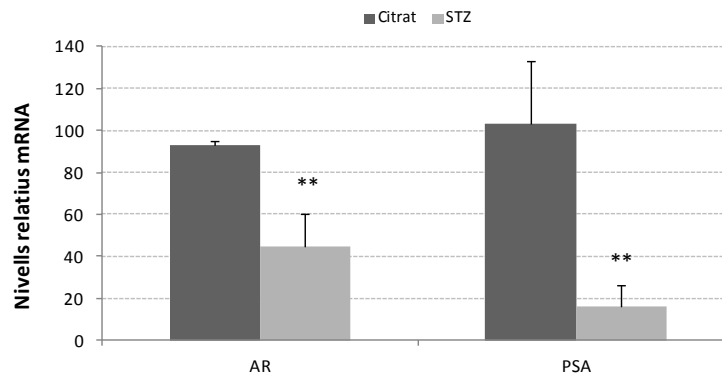


**Figura 110.** Tinció amb hematoxilina i eosina (H i E) i immunohistoquímica per l'AR sobre talls de tumors d'animals tractats amb citrat (**A i B**) i amb SZT abans de la implantació del tumor i sacrificats 7 dies després d'aquesta implantació (**C i D**).

#### **4.22 LA DIABETIS INDUÏDA AMB STZ PRODUËIX UNA REDUCCIÓ DEL NIVELL DE mRNA D'AR i DE PSA EN ELS TUMORS D'ANIMALS DIABÈTICS**

Seguidament, mitjançant la tècnica de la PCR quantitativa a temps real es van mesurar els nivells de mRNA de l'AR i del PSA tant en els tumors control com en els tumors procedents de ratolins diabètics. A l'analitzar els resultats vam observar que la hiperglicèmia reduïa els nivells de mRNA de l'AR i del PSA en els tumors procedents de ratolins diabètics al comparar-ho amb els animals tractats amb citrat (figura 111).

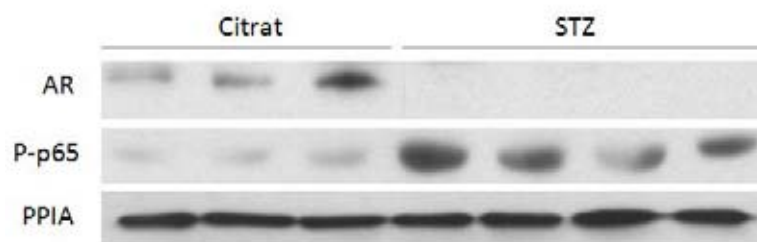




**Figura 111.** Nivells relatius de mRNA d'AR i de PSA dels tumors dels ratolins tractats amb citrat i STZ. El gen ribosomal S18 humà s'ha utilitzat com a gen normalitzador de la quantificació. La barra indica la desviació estàndard. \* $p < 0,05$  i \*\* $p < 0,01$  comparat amb citrat.

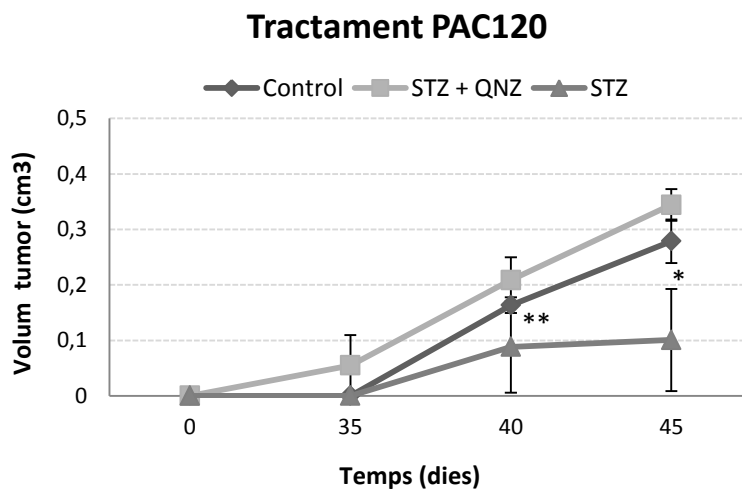
#### 4.23 LA HIPERGLICÈMIA REDUEIX ELS NIVELLS D'AR A TRAVÉS DE L'ACTIVACIÓ DE NF- $\kappa$ B EN EL MODEL ANIMAL

Vam voler comprovar en el model animal si la disminució dels nivells d'AR en el tumor de pròstata era a través de l'activació de NF- $\kappa$ B tal i com succeïa en les LNCaP. El primer que vam fer va ser realitzar un *western blot* per comprovar si els nivells de p-P65, subunitat de NF- $\kappa$ B, estaven augmentats en els animals amb diabetis induïda respecte dels animals control. Tal i com ja havíem observat en les LNCaP crecudes a 30 mM de D-glucosa, els animals amb la diabetis induïda presentaven una disminució de l'expressió de la proteïna d'AR acompanyada d'un augment de la fosforilació de la p65, al comparar-ho amb els animals control (figura 112).



**Figura 112.** Anàlisi dels nivells d'AR i de la fosforilació de la proteïna p65 en animals control i animals amb la diabetis induïda per la STZ. S'ha utilitzat PPIA com a gen normalitzador.

Seguidament, i per veure com afectava al creixement tumoral la inhibició de la via del NF- $\kappa$ B, es va realitzar un experiment en el qual teníem animals control (n=3), animals als quals se'ls hi havia induït la diabetis amb STZ (n=5) i animals amb diabetis induïda i tractats amb QNZ al mateix temps (n=5). Es va mesurar el tumor d'aquests animals un cop per setmana i observant el gràfic podem comprovar com els animals amb diabetis induïda amb STZ presenten un menor creixement tumoral significatiu estadísticament en els dies 40 i 45, comparat amb el creixement del tumor dels animals controls (figura 113). En canvi, al comparar el creixement tumoral dels animals control amb el creixement tumoral dels animals diabètics tractats amb QNZ no vam observar diferències significatives pel que respecta al volum tumoral, tot i que el creixement tumoral semblava superior en els animals tractats amb l'inhibidor de NF- $\kappa$ B (figura 113). Al fer la comparació del volum tumoral entre els animals amb la diabetis induïda amb STZ i els animals diabètics tractats amb QNZ vam veure que hi havia, tant al dia 40 com 45, diferències significatives en el creixement tumoral, sent aquest creixement tumoral menor en els animals diabètics, tal i com passava en la comparació amb els animals control (figura 113).



**Figura 113.** Gràfic on es mostra el volum del tumor dels ratolins control (n=3), dels animals amb diabetis induïda amb STZ després de la implantació tumoral (n=5) i dels animals amb diabetis induïda després de la implantació del tumor i tractats amb QNZ (5  $\mu$ g/mL) (n=5). La barra indica la desviació estàndard. \*p<0,05 i \*\*p<0,01, respecte el volum tumoral dels animals control.

Els nivells de glucosa dels animals es van mesurar un cop per setmana per comprovar que tant els animals amb la diabetis induïda amb STZ com els diabètics tractats amb QNZ

presentaven hiperglicèmia. Aquestes dades juntament amb els pesos dels animals es recullen en la taula següent.

	<b>CONTROL (N=3)</b>	<b>STZ (N=5)</b>	<b>STZ + QNZ (N=5)</b>
<b>PES INICIAL, g</b>	31,45 ± 3,96	28,18 ± 2,13	26,53 ± 2,57
<b>VOLUM TUMOR , cm<sup>3</sup></b>	0,28 ± 0,04	0,10 ± 0,09	0,34 ± 0,03
<b>GLICÈMIA, mg/dL</b>	117,89 ± 24,05	346,8 ± 117,30	300,8 ± 108,56

**Taula 23.** Recull de les dades referents a pes, volum del tumor i nivells de glucosa en sang per a cada grup d'animals. Les dades estan representades com a mitjana ± SD.

## 5.DISSCUSSIÓ

---



Un dels objectius d'aquesta tesi era el procés a través del qual el càncer de pròstata passa de ser hormonodependent a hormonoindependent. Per ser més exactes, el concepte d'homonoindependència l'hauríem de substituir pel terme de resistència a la castració (CRPC), ja que el primer terme fa referència a què el tumor no té necessitat de cap tipus hormonal, la qual cosa sembla ser que no és certa.

La hipòtesi de la qual partíem era que la supressió hormonal aplicada al càncer de pròstata jugaria un paper important en el desenvolupament de la hormono-resistència. Aquesta teràpia podria ser capaç de reduir el tumor inicialment però també de provocar la metilació de les illes CpG del promotor del receptor d'andrògens (AR1A), induint el silenciament d'aquest i contribuint així al desenvolupament de l'hormono-resistència.

## **5.1 ISOFORMES DEL RECEPTOR D'ANDRÒGENS**

El genoma humà està format per un nombre menor de gens dels que s'havien predit (Lander, Linton et al. 2001; Waterston, Lander et al. 2002). S'esperava que codifiqués per més de 150.000 gens, un nombre més elevat de gens que en *Drosophila*, que en té 14.000 (Adams, Celniker et al. 2000; Pennisi 2000) però l'any 2001 només se'n van identificar 32.000 (International Human Genome sequencing Consortium, 2001; (Venter, Adams et al. 2001). En una publicació recent s'estima que el nombre de gens humans és de 20000 (Pennisi; 2012). Les dades obtingudes l'any 2001 van donar lloc al reconeixement que una alta proporció del transcriptoma (93%) està constituïda per RNAs no codificants de seqüència llarga i curta amb diferents funcions (Katayama, Tomaru et al. 2005). Paral·lelament, el descobriment dels RNAi i dels miRNAs va portar a pensar que alguns dels RNAs de seqüència llarga eren tallats a RNAs més curts i funcionals (RNAs de menys de 200 nucleòtids) (Kim 2005).

De totes aquestes dades es va concloure que el nombre de mRNAs era molt més elevat que el nombre de gens, suggerint un rol important en la regulació de l'expressió gènica en la producció de complexitat (Modrek and Lee 2002). En l'espècie humana aquesta complexitat i variabilitat en els transcrits es pot donar per tres processos: l'ús de promotors alternatius i

de primers exons, mitjançant *splicing* alternatiu (de l'anglès, *alternative splicing* o AS) i mitjançant senyals de poliadenilació alternativa (exons 3' alternatius).

Un dels nostres objectius era determinar l'existència de nous exons alternatius d'AR que donessin lloc a trànscrips alternatius que es podrien manifestar després del silenciament de l'AR 1A i que podrien estar implicats en el procés de la hormonodependència.

L'any 2005, Ahrens – Fath i col·laboradors van descriure un nou primer exó alternatiu d'AR, que nosaltres l'hem anomenat exó 1B d'AR, que s'unia als exons del 2 al 8, donant lloc a un trànscrit que codifica per una proteïna de 45 KDa (AR45) (Ahrens-Fath, Politz et al. 2005). En el grup vam decidir estudiar la seqüència de l'exó 1B per determinar si aquest primer exó alternatiu també podria ser un acceptor d'*splicing* abans de buscar altres nous primers exons. Com que l'exó 1B presentava una seqüència rica en pirimidines, un *branch point* i un 3' ss consens, es va confirmar com un candidat a exó acceptor d'*splicing* (figura 30). Vam realitzar la tècnica 5' RLM-RACE per comprovar si existia algun altre exó situat més a 5' de l'exó 1B. Com a resultat de l'aplicació de la tècnica vam identificar 3 nous exons alternatius, els exons 1C, 1D i 1E, a més d'obtenir l'exó 1B (no precedit per cap altre exó) i l'exó 1A. L'exó 1C es localitzava en la posició 66692255 – 66692395, l'exó 1D es localitzava a la posició 66684460 – 66684591 del cromosoma X, mentre que l'exó 1E ho feia en la posició 66683766 – 66683939 (taula 15).

Per determinar si els nous exons complien les característiques d'un exó es van fer diferents estudis. Primerament es van caracteritzar *in silico* els tres nous exons alternatius analitzant les seves seqüències amb el programa ESEFinder 3.0 (Cartegni, Wang et al. 2003) per identificar potencials seqüències que participen en el procés de definició d'exons. Les proteïnes que s'uneixen a aquestes seqüències són les proteïnes reguladores d'*splicing* com serina/arginina (proteïnes SR) i hnRNPs (ribonucleoproteïnes nuclears heterogènies). Aquestes proteïnes assisteixen a la maquinària basal del spliceosoma en busca dels exons en les llargues seqüències intròniques. L'habilitat de les proteïnes SR en donar suport a aquesta maquinària ha portat a les isoformes alternatives a existir, i la seva proliferació al llarg de l'evolució ha augmentat l'AS (Keren, Lev-Maor et al.; Keren, Lev-Maor et al. 2010).

Després de fer l'anàlisi de les seqüències dels primers exons d'AR (1C, 1D i 1E) vam comprovar que tots tres presentaven potencials llocs d'unió per a les proteïnes SR (SF2/ASF,

IgM-BTCA1, SC35, SRp40 i SRp55), per tant, es recolzava l'existència dels exons trobats per 5'RLM-RACE (figura 36; taula 13).

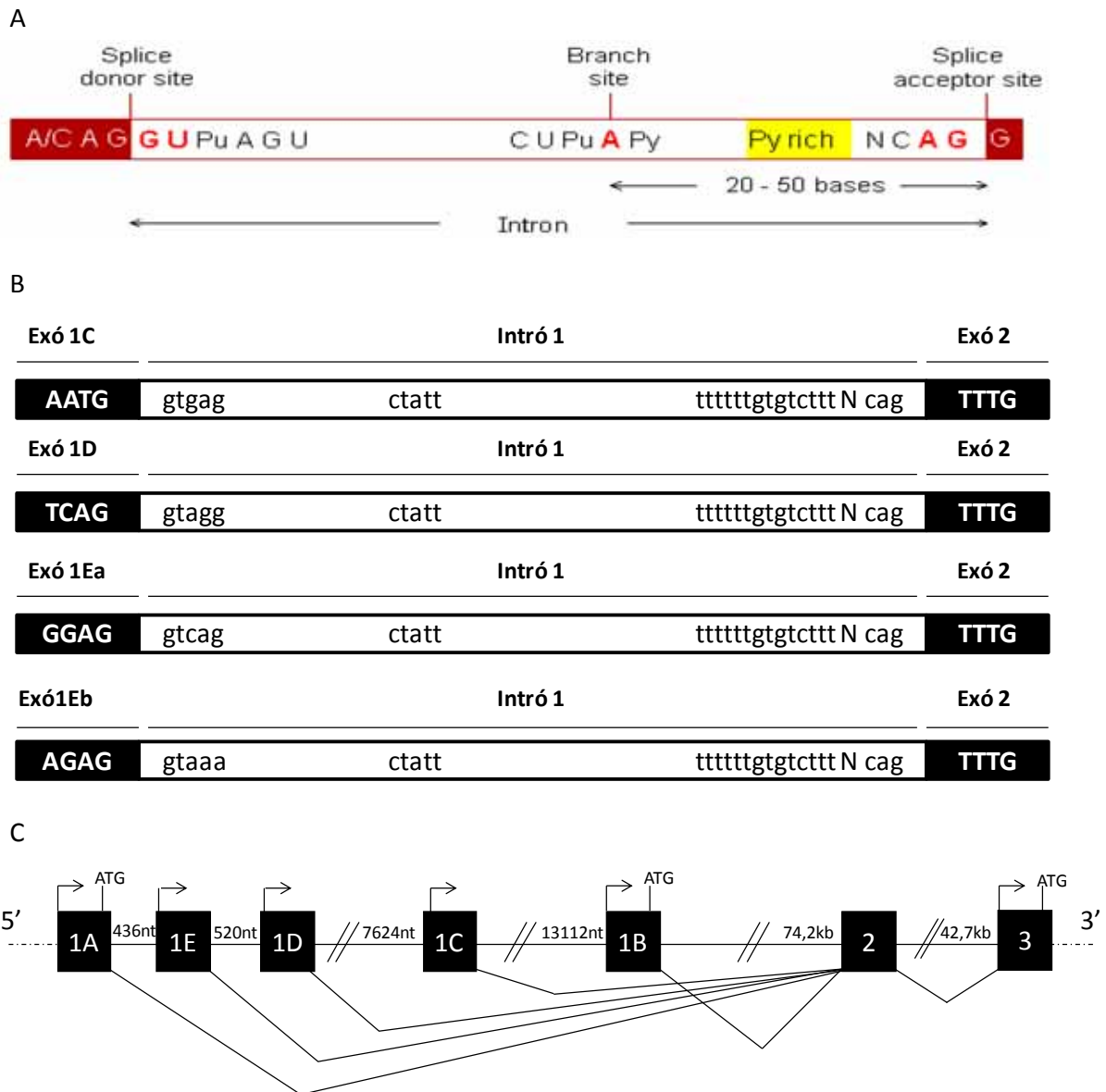
Una altra característica a tenir en compte a l'hora de determinar un exó és la seva llargada així com també la llargada relativa dels introns i dels exons (arquitectura exó – intró), variable en el regne eucariota. En vertebrats, els introns són més llargs i els exons són curts; sembla que la llargada de l'exó ha disminuït amb l'evolució (Sternier, Carlo et al. 1996; Fox-Walsh, Dou et al. 2005). En el cas dels nous primers exons d'AR, exó 1C, 1D i 1E presentaven una llargada de 141, 132 i 154 nucleòtids, respectivament. Aquests nous exons estaven dins de la mitjana de la llargada dels exons en metazous (125–165 nucleòtids), llargada similar a la del DNA que envolta el nucleosoma (147 nucleòtids) (Keren, Lev-Maor et al. 2010) i es trobaven localitzats en un intró (intró 1 d'AR) molt extès (22,1 kilobases). Aquest fet ens indica que l'ocupació del nucleosoma podria conferir una selecció més acurada en la llargada dels exons (Andersson, Enroth et al. 2009; Schwartz, Meshorer et al. 2009). S'ha descrit, però, que la llargada mitjana dels exons humans és de 126 nucleòtids (Schwartz, Meshorer et al. 2009), llargada que correspondria a la quantitat de DNA que envolta una estructura del subnucleosoma, el tetrasoma [(H3-H4)<sub>2</sub>] (Sivolob and Prunell 2004; Lavelle and Prunell 2007). El ditetrasoma té importància *in vivo* en la dinàmica del nucleosoma, en la transcripció i en la replicació (Alilat, Sivolob et al. 1999; Sivolob and Prunell 2004). S'especula que els exons humans requereixen una regulació més estreta que altres espècies per això el tetrasoma és reclutat i permet la regulació de l'AS a través del control transcripcional (Keren, Lev-Maor et al. 2010).

Normalment, els exons tenen un major percentatge de GC respecte de les regions flanquejants intròniques; regions amb més quantitat de GC afavoreixen l'ocupació per part del nucleosoma. Per això aquestes seqüències donen un mononucleosoma ben definit (Schwartz, Meshorer et al. 2009). L'alt contingut en GC en exons a prop de la regió flanquejant dels introns és una altra de les característiques que s'especula com un signe per a la identificació dels exons (Ast 2004; Ram and Ast 2007) i que nosaltres vam tenir en compte. L'exó 1C presentava un 53,2% de GC, l'1D presentava un percentatge de GC del 41% i l'exó 1E del 58,44%. Schwartz i col·laboradors havien descrit que l'ocupació del nucleosoma dins dels exons està altament relacionada amb el contingut GC d'aquests, amb una major ocupació on el percentatge de GC estava en l'interval 41% - 57% (Schwartz, Meshorer et al.



2009). Per tant, els nostres nous exons, una vegada més, complien una altra condició per a ser identificats com a exons. A més a més, els exons tenen més ocupació nucleosomal comparat amb els introns, i els exons estan enrotllats per histones amb modificacions (Andersson, Enroth et al. 2009; Tilgner, Nikolaou et al. 2009). Per tant, també caldria tenir en compte l'estructura de la cromatina, ja que influeix en la distinció de si un exó és alternatiu o constitutiu.

Vam analitzar les seqüències dels *splice sites* dels exons 1C, 1D i 1E (figura 114A) i vam comprovar que tots tres exons s'unien a l'exó 2 mitjançant seqüències 5' ss i 3' ss consens (figura 114B). A més a més, es va aconseguir amplificar mitjançant PCR semiquantitativa els transcrits sencers per a l'exó 1D (de l'exó 1D fins al 8) i de l'exó 1E (de l'exó 1E al 8), però no de l'1C. Sabíem gràcies a la tècnica del 5' RLM-RACE que el transcrit d'AR 1C contenia, al menys, de l'exó 1 a l'exó 5, però no vam aconseguir amplificar la seqüència sencera dels 8 exons. Un dels motius de no haver aconseguit el transcrit fins a l'exó 8 pot ser que aquest no existeixi. No es van trobar nous extrems 3' quan vam realitzar el 3' RACE, ni vam predir nous possibles senyals de poliadenilació alternativa en la seqüència genòmica quan es va utilitzar el programa PolyApred, i tot i intentar detectar l'expressió del transcrit fins a l'exó 8 en diferents teixits i línies cel·lulars, podria ser que no haguéssim amplificat o buscat en el teixit adequat. En la seqüència adjacent al 5'UTR de la isoforma AR1C vam determinar la presència d'una caixa TATA en la regió promotora (figura 45). Tenint en compte que la caixa TATA es troba en un terç dels promotors humans i que la seva presència està altament associada amb gens amb expressió específica de teixit i/o context específica del transcrit (Carninci, Sandelin et al. 2006), no podem descartar que no existeixi el transcrit sense d'AR1C; potser nosaltres no hem analitzat el teixit i/o les condicions adequades.



**Figura 114. A)** Estructura típica exó-intró en vertebrats on s'indiquen les seqüències consens dels *splice sites* (ss), del *branch point* i el tracte de pirimidines. **B)** Estructura dels primers exons alternatius d'AR que s'enllacen amb l'exó 2. S'indiquen els llocs donadors i acceptors d'*splicing* per cada un d'ells. **C)** Estructura genòmica de l'AR. S'especifiquen els inicis de transcripció i els inicis de traducció i la llargada dels introns.

Les isoformes 1D i 1E no presenten ni caixa TATA ni promotors rics en (G+C), però sí presenten altres elements que formen part del *core promoter* com el *Downstream Core Promoter Element* (DPE), o l'element iniciador (Inr) en el cas d'AR 1D (figura 45). Ohtsuki i col·laboradors van descriure que no és necessari que el promotor contingui tots els elements

per a ser funcional (Ohtsuki, Levine et al. 1998), tal i com havíem vist en el grup amb SHBG i els promotors de les seves unitats de transcripció (Pinos, Barbosa-Desongles et al. 2009).

Una nova isoforma alternativa pot donar lloc a una nova proteïna, possiblement albergant diferents dominis del transcrit original, o pot tenir un rol regulador equilibrant els nivells de mRNA de les proteïnes funcionals (Kim, Goren et al. 2008).

Per això, mitjançant el programa ORF Finder es va comprovar si algun dels tres transcrits presentaven un codó ATG en pauta amb el marc de lectura d'AR. Es va observar que cap d'ells (1C, 1D i 1E) presentava un ATG en pauta amb el marc de lectura de la proteïna. El primer ATG en pauta que va detectar el programa està localitzat en l'exó 3 d'AR, per tant, tots tres primers exons alternatius units a l'exó 2 i a gran part de l'exó 3 són seqüències 5'UTR. El transcrit al qual donen lloc cada un dels primers exons alternatius (AR1C, AR1D i AR1E) codificarien per una mateixa proteïna, una proteïna de 296 aminoàcids i d'aproximadament 35 KDa, coincidint amb la mida identificada en el *western blot* (figura 37).

Els exons 5'UTR poden modular la possible traducció dels transcrits, per això es va determinar la llargada dels 5'UTR, es va analitzar si aquesta seqüència presentava possibles elements reguladors de la traducció tals com uAUGs, si era una seqüència rica en GC, si tenia una estructura secundària (tots aquests elements dificultarien el procés d'*scanning* de la subunitat petita del ribosoma) o bé si presentava una seqüència 5'TOP (el tracte d'oligopirimidines terminal a 5' (5'TOP) és una seqüència que oscil·la entre les 5 i les 15 pirimidines que es troba en els mRNAs i que actua com un regulador de la traducció). Per aquest motiu es va incloure la presència d'aquesta 5' TOP com a element important en la caracterització de les seqüències 5'UTR. També es va aplicar la utilització de la classificació CART [Classification and regression tree; (Davuluri, Suzuki et al. 2000)] per determinar a quina classe de transcrits pertanyien totes 5 isoformes.

La seqüència 5'UTR dels transcrits iniciats amb els exons 1C i 1D és de gairebé 400 nucleòtids, i de més de 400 nucleòtids en els transcrits iniciats amb l'exó 1E. Estudis fets en cèl·lules han determinat que l'eficiència de traducció disminueix notablement quan l'estabilitat dels *hairpin* en els 5'UTR augmenta de -25 KCal/mol a -35 KCal/mol. Els extrems 5'UTR de les isoformes 1C, 1D i 1E presenten una  $\Delta G$  elevada superior als -35 KCal/mol (Babendure, Babendure et al. 2006), la qual cosa indica una dificultat en la traducció (figura

40, 42 i 43). Aquesta dificultat es veuria a més a més recolzada per la presència de uAUGs, sobretot en la seqüència 5'UTR d'1C i de 1D (en tenen 8 i 7, respectivament); 1E en presenta 5. El percentatge de GC és aproximadament del 40% en les seqüències 5'UTR d'1D i d'1E, i del 52% en 1C. Per tant, tenim el que el percentatge elevat en GC en l'exó corresponent en facilitaria el reconeixement per part de l'spliceosoma, però el percentatge elevat de GC en el 5'UTR s'ha relacionat amb la dificultat en la traducció, però també en la definició dels exons. Cap dels tres nous trànscrips presenta seqüència TOP i segons els resultats obtinguts en aquesta classificació CART, les tres seqüències 5' UTR serien de classe I, és a dir, seqüències amb nivells baixos de traducció. Aquesta classe inclou els mRNAs que codifiquen per factors de transcripció, factors de creixement, proto-oncogens i altres proteïnes reguladores que es tradueixen poc en condicions normals (en cèl·lules en estat de quiescència) (Davuluri, Suzuki et al. 2000). Si es comparen els resultats obtinguts en l'anàlisi de la traduïbilitat dels 5'UTR dels trànscrips 1C, 1D i 1E amb els valors dels resultats obtinguts en els 5'UTR dels trànscrips 1A i 1B, teòricament els trànscrips 1A i 1B no haurien de traduir-se, i en canvi, sí que ho fan. Per aquest motiu es van analitzar, mitjançant diferents construccions i l'assaig de siRNA, una possible traducció de les isoformes 1D i 1E (isoformes de les quals es va poder amplificar el trànscrit des de l'exó 1 a l'exó 8) (figures 58 i 59). Els resultats obtinguts en aquesta aproximació donen indicis d'una possible traducció i obren la porta a continuar fent estudis d'una possible traducció de les noves isoformes i de la regulació d'aquesta.

Sabem que l'existència de *loops* en el 5'UTR dificultar la traducció perquè impedeixen un bon *scanning* de la subunitat petita del ribosoma i l'acció de la proteïna eIF4A (Araud, Genolet et al. 2007; Sonenberg and Hinnebusch 2009). Alhora sabem que l'extrem 5'UTR juntament amb l'extrem 3' poden regular la vida mitjana dels trànscrips. Vam fer els assajos amb l' $\alpha$ -amanitina per a bloquejar la RNAPol II i així intentar fer un càlcul de la vida mitjana dels trànscrips iniciats amb els exons 1D i 1E. Els resultats obtinguts són confusos en les 4 primeres hores del tractament (figura 56). Les isoformes d'AR 1D i 1E tenen un comportament similar a AR1A a partir de les 6 hores de tractament, quan comencen a disminuir els nivells de mRNA, sent més pronunciada la disminució en AR1E que en 1D, respecte de l'AR 1A [aquest presenta una vida mitja de 6'6 hores en presència d'andrògens; (Syms, Norris et al. 1985)]. Sembla doncs que els trànscrips identificats en el nostre laboratori presentarien una vida mitjana similar a la descrita per l'AR 1A en presència d'andrògens, la qual cosa indicaria que aquests trànscrips podrien tenir una importància significativa en el

control de la transcripció i/o que tindrien una probabilitat elevada de ser traduïts. Per a cada un dels diferents trànscrips no s'ha estudiat la regulació deguda als miRNAs, però sabent que són seqüències que normalment s'uneixen al 3'UTR, i que les cinc isoformes comparteixen el mateix extrem c-terminal, els miRNAs descrits com a reguladors de l'AR1A podrien regular també AR1B, AR1D, AR1E i AR1C si contingués des de l'exó 1C a l'exó 8.

La conservació d'un patró d'AS a través de l'evolució dóna fortes evidències de la funció biològica ja que una isoforma no funcional serà objecte de la selecció natural negativa (Keren, Lev-Maor et al. 2010). Els exons alternatius conservats entre humans i ratolins estan enriquits en gens expressats en cervell i en gens implicats en la regulació transcripcional, el processament del RNA i el desenvolupament (Yeo, Van Nostrand et al. 2005).

La comparació filogenètica dels primers exons alternatius d'AR (taula 16) va confirmar que aquests exons estan conservats en els primats i en el brau (*Bos taurus*), i que no ho estan en ratolins (*Mus musculus*) així com tampoc ho està la isoforma 1B (Weiss, Faus et al. 2007). En els no mamífers tampoc apareixen els nous exons alternatius. En totes les espècies estudiades, excepte en el grup dels invertebrats (no apareix cap exó d'AR) es conserven els exons 2 i 3 d'AR. El fet que en primats i en brau es conservin evolutivament els nous exons d'AR trobats, així com els 2 ja descrits, indica que aquests exons tenen un paper important en la via de senyalització dels andrògens i que més estudis evolutius podrien ajudar a aclarir el paper dels andrògens i del seu receptor en moltes malalties, entre elles, el càncer de pròstata.

Vam utilitzar la base de dades Fantom4 [The FANTOM Consortium (Suzuki, Forrest et al. 2009)], on hi ha recollits gairebé tots els gens i les seves isoformes alternatives del genoma humà i del murí, per comprovar si algun dels nostres inicis de transcripció coincidís amb alguna seqüència detectada gràcies al mètode deepCAGE (seqüenciació exhaustiva seguida de CAGE: *Cap Analysis of Gene Expression*), mètode que permet detectar seqüències que mantenen l'estructura "cap" en el seu extrem 5'.

Tant en la búsqueda en el genoma humà com en el murí ens vam centrar en les 3 noves isoformes trobades en el grup. En el genoma humà vam obtenir que per la 1C no hi havia cap seqüència introduïda en el Fantom4 que correspongués o coincidís amb la que nosaltres vam trobar mitjançant el 5'RLM-RACE. En canvi, per a la seqüència corresponent a 1D vam trobar

un inici de transcripció detectat en sang per cada una d'elles, un TSS que es localitzava dins de l'exó 1D que nosaltres havíem identificat (cromosoma X: 66684473 – 66684493; cluster id: 4573521). Per a la 1E també vam trobar un inici de transcripció contingut en l'exó 1E (cromosoma X: 66683857 – 66683879; cluster id: 4573519) localitzat en sang. A l'analitzar el genoma murí vam comprovar que el volum de dades per l'Ar (receptor d'andrògens murí) en aquesta espècie era gairebé inexistent.

Un cop analitzades les 5 unitats de transcripció de l'AR vam voler comprovar l'expressió d'aquestes a nivell de mRNA. Concretament ens vam centrar en l'expressió en línies cel·lulars de càncer de pròstata, en el teixit prostàtic i en altres línies cel·lulars.

En la línia de càncer de pròstata hormonodependent LNCaP s'expressen tant 1A, 1B, 1D i 1E. En la línia hormonodependent PZ-HPV les isoformes 1A i 1E s'expressen poc mentre que la 1D s'expressa més. En les línies hormonoindependents PC3 i DU145 gairebé no s'aprecia l'expressió a nivell de mRNA d'AR1A, i sí que s'aprecia en 1E i en 1D, essent en aquest últim l'expressió superior (figura 49). El fet de trobar més expressada la isoforma 1D en les línies on gairebé no es detecta mRNA d'AR 1A ens pot fer pensar en una compensació en la regulació de les isoformes a nivell de mRNA, per tal de presentar sempre expressió del receptor d'andrògens. I aquest fet comporta un canvi en referència a les línies hormonoindependents ja que no podem dir que no expressen AR; el que no expressen és l'AR1A (110 KDa), en tot cas. En els teixits prostàtics analitzats, totes les cinc unitats de transcripció hi estan presents a nivell de mRNA, indicant així que tant la pròstata adulta com la fetal expressen totes les isoformes, i que la possible regulació compensatòria apareixeria bàsicament en malaltia.

Si tenim en compte els resultats obtinguts en l'anàlisi quantitatiu, veiem que entre les dues línies hormonodependents, en les LNCaP els nivells de mRNA d'AR (amplificant la part comuna a les isoformes) són més alts que en les PZ-HPV, i en aquest cas (condicions control) veiem que l'aportació de nivells de mRNA de cada isoforma sí que explicaria els nivells totals de mRNA d'AR (figura 54). En les línies hormonoindependents, i prenent com a valor de referència del 100% els nivells de les LNCaP, es va comprovar que les PC3 presentaven nivells de mRNA d'AR més alts que LNCaP o DU145. A l'analitzar l'aportació de cada isoforma als nivells de mRNA d'AR totals vam comprovar com en PC3 els nivells d'AR 1D i 1E eren molt

elevats i que l'aportació d'aquestes en els nivells totals de mRNA realment no era tan superior com semblava en el gràfic. En les DU145, en canvi, sembla que els nivells de mRNA d'AR totals sí que podrien estar influenciats pels nivells de mRNA de la isoforma 1E. En canvi, sembla que no tenen expressió de mRNA de 1D (figura 55).

En l'anàlisi de l'expressió de les isoformes fet en els PAC120 tractats amb FE200486 de manera constant i de manera intermitent, tal i com ja hem discutit anteriorment, també semblaria observar-se aquest efecte compensatori o l'augment de la unitat transcripcional 1D quan la unitat transcripcional 1A està disminuïda o la seva expressió és nul·la (figures 74, 75, 76 i 77).

Cal fer una menció al fet que les 4 unitats de transcripció, 1B, 1C, 1D i 1E no presenten l'exó 1A on s'havia descrit la funció transactivadora 1 (AF-1) ni els dominis FXXLF ni WXXLF (He, Kemppainen et al. 2000) que estableixen i dirigeixen la interacció entre AF-1 i AF-2 permetent la interacció intramolecular i intermolecular entre els dominis N-terminal i C-terminal (Dubbink, Hersmus et al. 2004). Per la mateixa raó, tampoc contenen el tracte de poliglutamines (CAG) ni el tracte de poliglicines (GGN), la llargada dels quals té un paper important en la malaltia de Kennedy i en el càncer de pròstata.

Les 4 unitats de transcripció mencionades sí que mantenen l'AF-2, que és dèbil transcripcionalment però és la major superfície d'interacció proteïna-proteïna (Moilanen, Rouleau et al. 1997). A més a més, és necessari per a la interacció amb el lligand quan s'ha produït la unió dels extrems N i C-terminal. Per tant, és molt necessària la continuació d'estudis transcripcionals que aportin més llum a la manera de com estan regulades les noves isoformes i si existeix una nova AF en els primers exons alternatius d'AR descrits en aquesta tesi.

Luco i col·laboradors van descriure l'any 2010 una relació directa entre AS i les modificacions d'histones (Luco, Pan et al. 2010); la modulació de les modificacions d'histones resulta en un canvi en els *splice sites*. Per tant, la nostra hipòtesi sobre l'aparició de nous trànscripats alternatius en la deprivació hormonal com a mecanisme de compensació en l'expressió de l'AR no estava desencaminada. Ara bé, com ja hem dit, faltaria realitzar estudis tant en la línia cel·lular com en el model animal per determinar si hi ha hagut canvis epigenètics i quins han estat.

## 5.2 NIVELLS DEL RECEPTOR D'ANDRÒGENS

Per determinar l'efecte que tenia la deprivació hormonal sobre l'AR vam créixer la línia cel·lular de càncer de pròstata hormonodependent LNCaP en condicions normals i en medi tractat amb el carbó actiu seguint el protocol detallat en l'apartat de materials i mètodes d'aquesta tesi. Sabíem que les LNCaP expressaven el mRNA de la isoforma 1A d'AR (110 KDa) i de la isoforma 1B (45 KDa) abans de deprivar d'hormones el sèrum del medi de creixement. Després de mantenir les cèl·lules en deprivació hormonal durant 24, 48 i 72 hores vam comprovar que els nivells de mRNA i de proteïna de la isoforma 1A havien disminuït respecte de les cèl·lules crescudes sense deprivació androgènica, sobretot a les 72 hores de tractament. Els nivells de mRNA de la isoforma 1B i de l'amplicó que reconeixia la part comuna de l'AR també havien disminuït en els tres temps de tractament. La disminució parcial de l'expressió de l'AR1A deguda a la supressió es recuperava, tant a nivell de mRNA com de proteïna, després de tractar les LNCaP amb un agent desmetilant (figura 64).

Per determinar l'efecte de la deprivació hormonal en els animals es van analitzar els nivells de mRNA de les diferents isoformes d'AR i de la part comuna de l'AR en les isoformes mitjançant PCR semi quantitativa i quantitativa en els animals tractats amb FE200486 de manera intermitent, i s'apreciava una disminució de l'expressió del mRNA del receptor en el T2 (màxima supressió hormonal). En tots els tractaments (FE200486 de manera intermitent, FE200486 constant, 5-AZA i FE200486 més 5-AZA) vam observar un comportament de l'AR1D a nivell de l'expressió de mRNA diferent al de l'AR1A i de la part comuna a totes les isoformes (figures 74, 75, 76 i 77). Tot i que no és possible comparar l'amplificació proporcionada per cada parella d'encebadors degut a diferències en l'eficàcia en l'amplificació, i que era difícil saber quina aportació fa cada isoforma als nivells de mRNA total, vam voler tenir-ne una idea aproximada, a part de saber si disminuïen o no els nivells de mRNA de cada isoforma de manera individual. Vam observar, doncs, que en totes les condicions de tractament excepte en el tractament realitzat només amb la 5-AZA, els nivells de mRNA de l'AR1D estaven molt més elevats en el T2 que no pas els nivells de mRNA de les altres dues amplificacions fetes. Així doncs, tenim augment dels nivells de mRNA d'AR1D, però no sabem quina proporció representen respecte de l'AR1A o en l'AR en general. Fixant-nos amb els nivells de la part comuna de l'AR amplificada, podríem dir que l'aportació d'AR1D no sembla ser la de major importància, indicant encara més que aquests grans canvis



que s'observen a nivell individual en l'amplificació de l'AR1D tenen poca repercussió en els nivells generals de mRNA d'AR. Això suggeriria hi hauria una mena de compensació o de regulació negativa entre l'expressió d'AR1A i d'AR1D, és a dir, que en els moments dels tractaments on sembla que hi ha una disminució dels nivells de mRNA d'AR1A s'observa també un augment dels nivells de mRNA d'AR1D, però no prou elevat per mantenir els nivells de mRNA totals d'AR constants. En els animals tractats únicament amb 5-AZA l'expressió de l'AR1D entre el T1 i el T2 gairebé no varia, indicant que la metilació del DNA no afecta a la transcripció d'aquesta isoforma directament, degut a què no presenta illes CpG en el seu promotor. En canvi, la recuperació de gairebé els mateixos nivells d'expressió de mRNA en l'AR1A, que sí presenta illes CpG en el seu promotor, i en la part comuna de l'AR, fan pensar en el gran pes de la isoforma 1A en els nivells totals de mRNA d'AR.

Els nivells de mRNA es comparen amb el T1 de cada tumor per disminuir la variabilitat en els nivells d'expressió de l'AR entre els diferents animals.

A l'analitzar els nivells de proteïna de les línies cel·lulars i dels tumors procedents dels animals sotmesos a diferents tractaments per *western blot* vam comprovar que els nivells de l'AR de 110KDa disminuïen gairebé al 100% en la deprivació hormonal, mentre que a l'analitzar els nivells de proteïna d'AR de 35 kDa vèiem una disminució, però no del 100%. Aquest fet podria ser degut, en part, pels nivells de mRNA d'AR1D que vam observar en l'amplificació de mRNA a temps real, però no ho podem assegurar ja que no vam poder mesurar en la PCR quantitativa a temps real els nivells de l'AR1E ni els d'AR1C. No obstant, el fet que l'AR de 35 kDa no disminueixin de la mateixa manera que els d'AR de 110KDa recolzen la idea d'una regulació negativa entre isoformes o de la formació d'heterodímers per controlar-ne l'expressió a nivell de proteïna, tal i com s'havia demostrat entre l'AR45 i l'AR 110KDa (Ahrens-Fath, Politz et al. 2005).

A l'analitzar la tinció i la localització cel·lular d'AR de 110 kDa mitjançant immunohistoquímica vam observar que, en els animals tractats amb FE200486 de manera intermitent, en el temps màxim de supressió (T2) no hi havia tinció positiva d'AR, mentre que en el T1 i en el T3 (després de l'alliberament de la supressió) s'observava clarament una tinció positiva i nuclear, sent encara més intensa en el T3 (figura 81). Els nostres resultats estarien d'acord amb el que s'ha descrit a la literatura; quan el tumor es torna resistent a la

castració té més expressió d'AR (Linja, Savinainen et al. 2001; Edwards, Krishna et al. 2003). En el tractament combinat (FE200486 + 5-AZA) la tinció per l'AR de 110kDa té un comportament similar (figura 80). Els tumors procedents dels animals tractats amb FE200486 de manera constant no presenten tinció positiva per l'AR de 110 KDa (figura 81).

Sabiem que el tractament amb el FE200486 havia funcionat en els animals perquè les pròstates endògenes presentaven una tinció negativa per l'AR així com també per la disminució evident de la mida dels testicles d'aquests animals.

Com ja hem comentat anteriorment, l'objectiu de la tesi no era estudiar les diferents vies d'activació de l'AR en condicions de deprivació hormonal i la resposta a diferents fàrmacs sinó esbrinar el paper de la metilació en el procés. No obstant, seria interessant utilitzar les mostres obtingudes dels animals per analitzar les vies de supervivència involucrades en l'escapament hormonal (Culig, Hobisch et al. 1994), com Her-2/neu, mTOR/AKT o ERK1 i 2, totes elles implicades en la fosforilació d'AR (Feldman and Feldman 2001; Guo, Dai et al. 2006) ja que l'alteració de la via AKT, per exemple, s'ha associat amb la progressió i l'emergència de tumors androgen independents (Bedolla, Prihoda et al. 2007).

### **5.3 EFECTES DE LA DEPRIVACIÓ ANDROGÈNICA EN EL CREIXEMENT TUMORAL**

El tractament de deprivació hormonal es va dur a terme amb un antagonista de la GnRH, el FE200468, actualment conegut com degarelix (Firmagon®, Ferring Research Institute Inc., San Diego, CA) (Guyader, Ceraline et al.; Guyader, Ceraline et al. 2012) per simular el tractament de supressió hormonal que se'ls hi ofereix als pacients amb càncer de pròstata i avaluar la resposta del tumor.

Per tal d'explorar la nostra hipòtesis i aprofundir més a partir dels resultats obtinguts amb els experiments realitzats amb les LNCaP, vam utilitzar el model de xenograft de càncer de pròstata PAC120. Els animals tractats es van dividir en diferents grups segons el tipus de tractament rebut (FE200486 de manera intermitent, FE200486 de manera constant, FE200486 + 5-AZA, 5-AZA i el grup control). Vam comprovar que cap dels tractaments ni les dosis aplicades en els animals no fossin tòxics per a aquests, seguint els paràmetres indicats

en la taula 1 de l'apartat materials i mètodes de la tesi. Per tant, sabem que els nostres resultats no pateixen cap interferència d'aquest tipus. En el cas del co-tractament FE200486 i 5-AZA, es va administrar primer l'agent desmetilant per evitar toxicitat neuronal en els animals, seguint les instruccions publicades per Lantry i col·laboradors (Lantry, Zhang et al. 1999). Vam comprovar que el tractament només amb la 5-AZA no era capaç de disminuir el volum del tumor, per tant, tots els canvis observats en el volum tumoral dels animals tractats i/o co-tractats era atribuïble al fàrmac antagonista FE200486 o a una sinèrgia del FE200486 més la 5-AZA.

Els resultats obtinguts amb el tractament amb FE200486 dels animals que duïen el xenograt de càncer de pròstata ens van permetre concloure que aquest tractament és capaç de disminuir i inhibir el creixement del tumor. Per poder entendre quina modalitat de tractament (intermitent, constant o combinat amb altres fàrmacs) podria ser el més indicat en el càncer de pròstata es van comparar els diferents grups de tractament.

En els animals tractats amb FE200486 de manera intermitent es va observar que la mitjana dels volums tumorals era inferior a la mitjana dels volums del grup co-tractat amb FE200486 i 5-AZA (figura 71). Al comparar el temps que tardava el tumor en tornar a créixer, és a dir, a tornar-se recurrent i provocar una recidiva, en el grup co-tractat el creixement tumoral es retardava respecte dels tractats amb FE200486 de manera intermitent. El grup tractat amb FE200486 + 5-AZA presentava inicialment una mitjana de volums tumorals superior a la del grup tractat amb FE200486 de manera intermitent, però després en disminuïa el volum sent el grup que va tardar més en reprendre el creixement tumoral. Aquests resultats referents al volum ens indicaven que la mitjana del volum tumoral dels animals tractats amb FE200486 de manera intermitent era inferior a la mitjana del volum del tumor dels animals co-tractats, però que l'aturada en el creixement, i per tant el temps de resposta a la teràpia era més llarg en els co-tractats que els que havien seguit el tractament únicament amb FE200486 de manera intermitent (figura 69). Tot i que els co-tractats presentaven un període de temps més llarg abans de la recurrència, en el moment de tornar a créixer el tumor, aquest ho feia de manera ràpida. Aquest fet ens podria indicar que la presència de cèl·lules progenitores (que no necessitarien de la presència d'andrògens per sobreviure) en el tumor podria ser la causa de la supervivència tumoral i de la recidiva després de la retirada del tractament (Sharifi, Hurt et al. 2008). Malgrat que l'inici del tractament amb 5-AZA per a iniciar la

desmetilació o l'impediment de la metilació de *NOVO* s'hagués realitzat abans del tractament de deprivació, la combinació de tots dos fàrmacs és un tractament que retarda la resistència a la castració del càncer de pròstata però sembla que en el moment de la recurrència donaria lloc a un tumor més agressiu ja que s'hauria adaptat a un medi sense andrògens i seria resistent a aquestes condicions. Si s'hagués realitzat primer el tractament amb FE200486 i després s'hagués co-tractat amb la 5-AZA hauríem esperat veure una disminució del volum del tumor en el tractament amb FE200486 que hagués revertit poc temps després del tractament amb la 5-AZA. Aquest hipotètic resultat estaria a favor de la hipòtesi que la deprivació hormonal provoca el silenciament de l'AR i/o el silenciament dels gens que regulen a aquest provocant inicialment una aturada transitòria del creixement tumoral però provocant després un tumor resistent a la teràpia i més agressiu (Jarrard, Kinoshita et al. 1998; Liu, Wang et al. 2009; Friedlander, Roy et al. 2011).

Al comparar la mitjana dels volums tumorals del grup tractat amb FE200486 de manera intermitent amb la mitjana del grup tractat amb FE200486 de manera constant vam comprovar que en el primer grup la mitjana dels volums dels tumors era superior i que iniciava el seu creixement de nou abans que el grup tractat amb FE200486 de manera constant (figura 72). Aquesta diferència de temps entre el primer grup i el segon era de 8 setmanes, indicant també que la supressió hormonal de manera constant retarda el procés de resistència a aquest tractament, respecte del tractament intermitent. A més a més, si comparem el temps en el qual el tumor torna a créixer entre els animals co-tractats i els tractats constantment amb FE200486, observem que la mitjana dels volums dels tumors dels animals sotmesos a deprivació constant tarda més temps a recuperar-se que en els co-tractats. Tot i que hagués estat molt interessant, no es van realitzar experiments de co-tractament amb 5-AZA i FE200486 de manera constant. Però a partir dels resultats observats en els grups d'animals, i tenint en compte la nostra hipòtesi, probablement haguéssim vist un retard encara més pronunciat en la recuperació del volum tumoral, indicant així que el tractament amb un agent que inhibeixi la metilació del promotor d'AR o la del promotor d'algun gen que regula a aquest, encara retardaria més el procés de resistència a la castració. No es pot descartar que en el moment de la recidiva, aquest tumor fos encara més agressiu que si hagués estat tractat només amb el FE200486 degut a la possible presència de cèl·lules mare resistents a la deprivació, tal i com s'ha discutit anteriorment. Dels nostres

experiments en podem treure la conclusió de què el tractament de supressió intermitent en el càncer de pròstata tindria una pitjor resposta que el tractament constant o el co-tractament, indicant segurament un pitjor pronòstic de la malaltia i donant lloc a un tumor més agressiu. Creiem que tindrien un pitjor pronòstic en la malaltia perquè 3 animals que van rebre tractament amb FE200486 de manera intermitent van presentar dificultat en el moviment de les extremitats posteriors, provocant-los-hi una dificultat per desplaçar-se. A aquests animals se'ls hi van realitzar radiografies i a un d'ells una ressonància magnètica per comprovar si tenien alguna lesió òssia. Tot i que les imatges obtingudes de les dues tècniques mencionades van ser revisades per especialistes, no les hem inclòs en els resultats d'aquesta tesi perquè no vam poder demostrar amb altres mètodes els resultats obtinguts/interpretats. En la ressonància magnètica no semblava observar-se cap canvi entre els animals tractats amb FE200486 de manera constant i els animals control. En les imatges obtingudes mitjançant raig x s'observaven algunes vèrtebres liquades (les més properes a la cua) així com també una lleugera malformació a l'alçada del maluc d'un dels ratolins i un engruiximent del fèmur en un altre dels ratolins. Aquests canvis podrien ser els causants de les dificultats i alteracions motores dels animals a més a més de la caquèxia observada. En un dels animals es va observar una imatge de major densitat en la mandíbula de l'animal, indicant una possible metàstasi òssia en aquest ratolí tractat amb FE200486 de manera intermitent. A més a més, els tumors implantats que portaven aquests animals es veien calcificats. En els animals tractats de manera constant amb el FE200486 no es va observar cap dels fenotips descrits. Així doncs, aquests resultats reforçarien els resultats obtinguts amb altres tècniques en els ratolins tractats amb FE200486 de manera intermitent, indicant un pitjor pronòstic i desenvolupament de possibles metàstasis.

En resultats obtinguts recentment per Guyader i col·laboradors també demostren que la deprivació androgènica intermitent augmenta el risc de recurrència i redueix el temps de progressió comparat amb la castració contínua (Guyader, Ceraline et al. 2012).

Una qüestió interessant a tenir en compte és el fet que el bloqueig absolut d'AR per l'ús de diferents antagonistes augmenta el risc d'escapament de la teràpia respecte a la castració. Aquest bloqueig total encara exerceix més pressió en la via de senyalització d'AR, activant múltiples vies de supervivència. Aquest risc i activació encara és major en el tractament intermitent però no afecta a la supervivència de l'individu (Guyader, Ceraline et al. 2012).

Nosaltres no hem bloquejat l'AR sinó l'eix hipotàlem-hipòfisari-gonadal, per tant, podem dir que el tractament amb FE200486 de manera intermitent és pitjor que el tractament constant o combinat amb altres fàrmacs ja que provoca una activació més primerenca de la via d'actuació no genòmica de l'AR.

#### **5.4 MORFOLOGIA TUMORAL**

Els tumors tractats amb FE200486 de manera intermitent i encara més els tractats de manera constant presentaven àrees necròtiques, alt índex mitòtic i eren tumors mucinosos. Els animals tractats amb FE200486 de manera constant presentaven un gran canvi en la morfologia tumoral, ja que gairebé no presentaven glàndules prostàtiques (figura 81). Tot i presentar aquestes característiques també observades per Guyader i col·laboradors (Guyader, Ceraline et al. 2012), en els PAC120 tractats amb FE200486 de manera intermitent i en els PAC120 co-tractats amb FE200486 i 5-AZA (figura 80) vam observar una millor distribució i definició glandular. Guyader i la resta d'investigadors del grup de la Dra Poupon han utilitzat el model PAC120 per estudiar les diferents vies de senyalització implicades en el càncer de pròstata resistent a la castració així com també testar diferents fàrmacs amb el model. Nosaltres no hem utilitzat el model amb aquestes finalitats, però ens interessava saber el resultat de l'anàlisi de les possibles alteracions genètiques degudes a la deprivació androgènica. Guyader i col·laboradors van observar que les detectades no seguien un patró específic atribuïble al tractament. El grup també va analitzar possibles mutacions en l'AR, i tal i com ja s'havia comprovat anteriorment (Legrier, Guyader et al. 2009), no se'n van detectar.

Els resultats obtinguts en els tumors dels animals tractats amb els diferents fàrmacs confirmen que la deprivació hormonal provoca necrosi i/o apoptosi de les cèl·lules epitelials humanes del xenograft en el moment màxim de la supressió i que fins i tot és capaç de gairebé eliminar-les en un tractament constant de deprivació. No obstant, aquestes cèl·lules reminescents que en mantenen en el tumor i que són negatives en la tinció d'AR podrien ser les causants de la recidiva del tumor de pròstata provocant que aquest càncer sigui més agressiu. La histologia observada en els tumors de pròstata dels animals tractats amb FE200486 de manera intermitent s'inclinaria més cap a una disminució del Gleason, indicant

així que en el T3 el tumor podria ser menys agressiu i presentar un millor pronòstic, fet que està en total contradicció amb els resultats obtinguts en analitzar el creixement tumoral i les conseqüències en la salut dels animals.

## 5.5 METILACIÓ

Des dels últims 25 anys han augmentat les evidències de què l'epigenètica juga un paper important en la biologia cel·lular. Aquest potencial s'exemplifica en la metilació aberrant del DNA en càncer, a nivell de gens individuals o a escala de tot el genoma. En altres malalties, també hi ha alteracions del DNA gràcies als perfils de metilació. La detecció primerenca del tumor és el factor més important per un tractament fructífer. La utilització de les modificacions d'histones requereix encara del perfeccionament de les tècniques (es fa amb anticossos), i a més, són modificacions menys estables i més dinàmiques que la metilació del DNA (Berdasco and Esteller; Feinberg 2007). Les noves tecnologies com microarrais de DNA metilat i la seqüenciació (o piroseqüenciació) del genoma després de la bisulfitació del DNA han reforçat el paper de l'epigenètica en les malalties humanes (Heyn and Esteller; Heyn and Esteller 2010; Heyn and Esteller 2012). La detecció d'aberracions epigenètiques és una eina prometedora per al diagnòstic i pronòstic de malalties i per a la predicció de la resposta al tractament amb fàrmacs. En càncer, evidències recents han donat una indicació de processos de metilació del DNA més enllà de la hipermetilació del promotor en les illes CpG dels gens supressors de tumors (Berman, Weisenberger et al. 2012; Hansen, Timp et al. 2012; Jones 2012). La metilació del DNA també informa del pronòstic en termes de recurrencia del tumor i la supervivència. En el càncer de pròstata, la combinació de biomarcadors hipermetilats (com el GSTP1, amb una sensibilitat del 80% i una especificitat del 95%) ha aconseguit una alta sensibilitat en la detecció del càncer.

Esbrinar el paper de la metilació en el procés cap a la hormono-resistència i identificar quina zona del promotor era més susceptible a ser metilada durant la supressió androgènica va ser un dels objectius que vam abordar.

El promotor d'AR (X78592.1) és una seqüència de 6905 nt. Per tal de facilitar l'anàlisi de la metilació es va decidir dividir-la en 3 regions, la regió 1, la regió 2A i la regió 2B. A l'hora d'analitzar la metilació en les LNCaP es va escollir la regió 2B perquè era la regió que comprenia l'inici de la transcripció del receptor i creïem que podria ser la més afectada per aquest tipus de modificació epigenètica. Es va comprovar que en aquesta regió no hi havia cap canvi en el patró de metilació entre les condicions de creixement control, de deprivació hormonal i de deprivació hormonal més l'agent desmetilant, en les LNCaP.

Aquests resultats ens indicaven que hi havia hagut un procés de metilació com a resultat de la deprivació hormonal però no en el promotor d'AR. La metilació es podria haver donat en el promotor d'alguns dels TF activadors que s'uneixen al promotor de l'AR per regular-ne l'activitat transcripcional. Per aquest motiu vam analitzar les diferents regions del promotor d'AR (regió 1, 2A i 2B) per comprovar quins TF s'hi unien i si presentaven illes CpG en els seus promotors (taula 18). Vam comprovar que en totes tres regions del promotor s'hi unien diferents factors de transcripció, sent la regió 2A on s'unien més factors de transcripció, entre ells el Sp1, el promotor del qual presenta illes CpG. D'altres factors de transcripció com AP-2, c-Ets o RAF també presentaven illes CpG (dades extretes de <http://genome.ucsc.edu/>).

No es van analitzar altres canvis epigenètics que podrien tenir lloc de manera més primerenca a la metilació que poguessin explicar la disminució d'expressió a nivell de mRNA i de proteïna, i que afectarien també a la transcripció de l'AR. Una altra possibilitat per la qual no detectem metilació del DNA en el promotor d'AR podria ser degut a una estructura secundària complexa d'aquest que dificultés les modificacions d'histones i la metilació del DNA.

No vam tractar durant més temps la línia cel·lular perquè tot i que ja està descrit que la deprivació hormonal les atura en el cicle cel·lular, nosaltres vam observar que l'aturada era parcial ja que es dividien més lentament, per tant, continuaven proliferant, amb la qual cosa el cultiu requereix ser resembrat per expandir-lo. En les LNCaP control no hi ha cap problema per expandir-les, però en les condicions de deprivació sí, ja que la línia cel·lular necessita de tots els components del sèrum per a adherir-se a la placa de cultiu. Com que les LNCaP necessiten estar sembrades a una certa confluència per no aturar-se en el cicle cel·lular, i teníem l'inconvenient de no poder-les resembrar, vam decidir continuar en el



model *in vivo* per aprofundir en les primeres evidències de la metilació com a canvi epigenètic degut al tractament. A més a més, un cultiu cel·lular de LNCaP prolongat en la privació hormonal podria haver induït una diferenciació morfològica semblant a la neuroendocrina (Rothermund, Gopalakrishnan et al. 2004).

Una part experimental abordada i no mencionada en l'apartat de resultats és el tractament de la línia cel·lular amb Casodex. El Casodex (bicalutamida) és un antiandrogen oral no esteroïdal utilitzat per tractar el càncer de pròstata i l'hirsutisme (Schellhammer 2002; See and Tyrrell 2006; Tyrrell, Iversen et al. 2006). En la literatura està descrit que les LNCaP presenten mutacions puntuals en el LBD; algunes d'elles no afecten l'especificitat d'unió del lligand mentre que altres sí (Veldscholte, Berrevoets et al. 1992). La mutació T877A és una de les mutacions puntuals descrites que afecten l'especificitat del lligand (Culig, Hoffmann et al. 1999). Per això vam descartar aquest tipus de tractament, així com també tractar les LNCaP amb R1881, un androgen sintètic, ja que no era el nostre objectiu estudiar com afecten les diferents mutacions de l'AR en les LNCaP en els diferents nivells d'acció dels esteroides i antiesteroides.

A l'analitzar la metilació del promotor de l'AR1A en els animals tractats amb FE200486 de manera constant també vam detectar que la regió 2B del promotor no es metilava, i en canvi sí que ho feien la regió 2A i la 1, sent aquesta última la que pateix més aquest canvi epigenètic. Aquest canvi observat en els animals castrats durant més temps (figura 83) recolzava l'existència de canvis epigenètics més primerencs a la metilació del promotor de l'AR, així com també la possible metilació del promotor de gens que regulen l'AR en el tractament intermitent, com passava en les LNCaP.

Gràcies a l'epigenètica s'han identificat marcadors específics de tumors amb resposta a fàrmacs que poden predir la resposta al tractament de (Heyn and Esteller 2012). Per això és important continuar estudiant la metilació i altres canvis epigenètics en els gens que regulen l'AR per saber la importància d'aquests en el càncer de pròstata i la seva progressió per desenvolupar nous tractaments més específics (Djebali, Davis et al. 2012).

## 5.6 LOCALITZACIÓ DEL RECERTPOR D'ANDRÒGENS A LA MITOCÒNDRIA

Sekeris, l'any 1990, va suggerir la presència dels receptors esteroidals i tiroïdals en diferents cèl·lules i teixits i uns anys més tard es va provar en diferents estudis (Sekeris 1990; Demonacos, Karayanni et al. 1996; Koufali, Moutsatsou et al. 2003; Scheller, Seibel et al. 2003; Chen, Delannoy et al. 2004; Chen and Yager 2004). L'any 2005, Solakidi i col·laboradors van descriure la presència nuclear i mitocondrial de l'AR de 110 kDa en les LNCaP en condicions normals de creixement, és a dir, en presència d'hormones (Solakidi, Psarra et al. 2005) així com també s'ha detectat l'AR a mitocondria en altres cèl·lules eucariotes [limfòcits, fetge de rata, cervell i altres línies cel·lulars (Scheller, Seibel et al. 2003; Gavrilova-Jordan and Price 2007)].

En les LNCaP crescudes en deprivació hormonal, i mitjançant immunocitofluorescència, vam detectar una disminució o desaparició de la tinció nuclear d'AR utilitzant un anticòs dirigit contra la part N-terminal del receptor. En canvi, a l'utilitzar un anticòs dirigit contra l'extrem C-terminal de l'AR vam veure una tinció positiva del receptor al citoplasma. En condicions de creixement normals de les LNCaP (medi complementat amb el 10% FBS) tots dos anticossos marcaven una localització nuclear de l'AR (figura 84).

Amb aquests antecedents i sabent de l'existència d'una variant d'splicing, l'AR23, que es va detectar al citoplasma i en agregats perinuclears, i que co-localitzava parcialment amb el reticle endoplasmàtic (Jagla, Feve et al. 2007), vam decidir determinar en quin orgànu es detectava l'AR en deprivació hormonal. Ho vam fer mitjançant una co-immunocitofluorescència utilitzant una proteïna mitocondrial, la COX I, com una primer aproximació ja que estava descrit que l'AR en LNCaP i en condicions control es trobava a la mitocondria. Vam comprovar que realment en LNCaP deprivades d'hormona l'AR es trobava a la mitocondria, així com també s'hi localitzava en les línies cel·lulars hormonoindependents PC3 i DU145 (estan descrites a la literatura com a línies hormonoindependents, és a dir, poden créixer sense la presència d'hormona, i a més a més, no expressen l'AR de 110 kDa) (figura 85). En els tumors dels PAC120 castrats també s'observava el canvi de la localització d'AR, passant de ser AR nuclear en els tumors dels animals no castrats a AR mitocondrial en

els castrats, indicant que possiblement en els tumors resistents a hormones la localització d'AR no és nuclear sinó mitocondrial (figura 87).

Les proteïnes mitocondrials sintetitzades al citosol en forma de precursor es transloquen a la mitocòndria mitjançant mecanismes postraduccional. La majoria dels precursors tenen una seqüència senyal en l'extrem N-terminal (Humphries, Streimann et al. 2005). L'AR, el GR i l'ER $\beta$  no tenen descrits aquests senyals de localització mitocondrial a N-terminal a la literatura però presenten seqüències semblants a les observades en proteïnes de la membrana mitocondrial interna les qual són dirigides a la mitocòndria per senyals proteics interns (Psarra and Sekeris 2008). Per aquest motiu i pel fet de detectar AR nuclear amb tots dos anticossos i només detectar l'AR citoplasmàtic amb l'anticòs que reconeix l'extrem C-terminal de la proteïna es van portar a terme les prediccions *in silico*. Aquestes prediccions realitzades amb diferents programes (taula 20) van determinar possibles senyals de localització o d'importació mitocondrial en la seqüència d'aminoàcids de l'AR no descrites abans en la literatura. La predicció de les possibles seqüències d'importació mitocondrial i la localització mitocondrial d'AR segons l'anticòs utilitzat ens suggeria diferents possibilitats. La primera d'elles podria ser que en les condicions de deprivació hormonal l'AR de 110 KDa es silenciï, o bé per metilació del seu promotor o per la metilació del promotor de gens que regulen l'AR. Aquest silenciament s'associaria a l'augment dels nivells de les altres isoformes d'AR descrites pel grup, de 35 KDa aproximadament, i/o l'AR de 45 KDa. Aquestes isoformes d'AR es podrien localitzar a la mitocòndria tot i que mirant les prediccions de la localització mitocondrial d'AR sembla que només en un dels programes, el ELM, donaria una senyal fora de l'extrem N-terminal, que compren des dels aminoàcids 1 al 517. La resta de programes sembla que situarien aquestes hipotètiques senyals en l'extrem N-terminal d'AR 1A, indicant que existeix una possibilitat que l'AR de 110 KDa es localitzi tant al nucli com a la mitocòndria. La segona explicació podria tenir a veure amb la formació d'heterodímers entre les diferents isoformes d'AR. Ahrens – Fath i col·laboradors ja van descriure que l'AR45 i l'AR de 110 KDa (isoformes 1B i 1A, respectivament) formaven heterodímers, i que aquesta formació exercia un control sobre l'expressió de l'AR 1A, inhibint així la seva expressió. Així doncs, tot i que totes les isoformes d'AR tinguessin la capacitat de translocar-se a la mitocòndria, podria ser que AR 1B s'unís a AR 1A, inhibint-ne la seva funció i deixant així actuar a AR 1C, 1D i/o 1E, ja que la formació d'heterodímers entre AR45-AR110 (AR1B-AR1A)

evitaria la formació d'heterodímers d'AR110-AR35 permetent que els homodímers AR-35 es formessin i poguessin actuar.

Una tercera possibilitat que podia explicar l'augment de la localització mitocondrial de l'AR seria un possible augment de la biogènesi mitocondrial. Aquesta hipòtesi la vam descartar després d'obtenir la fracció mitocondrial de les LNCaP control i de les deprivades i demostrar que no hi havia un augment en la biogènesi mitocondrial (figura 86). Per tant, el fet que hi hagi un augment de proteïna d'AR en la mitocòndria en condicions de supressió hormonal no és degut a un augment del nombre de mitocòndries, sinó probablement a un canvi de localització del receptor o a un augment en la síntesi i translocació mitocondrial d'aquest, sent aquesta última la interpretació que en fem dels nostres resultats.

Tot i que en el nostre laboratori no es van fer més experiments per determinar l'existència real d'aquesta importació a la mitocòndria, creiem que els resultats obtinguts en la predicció *in silico* obren un camí important per determinar una nova via de senyalització de l'AR acompanyada d'una funció diferent i desconeguda fins ara, ja que desajustaments en les funcions mitocondrials s'han associat amb malalties neurodegeneratives i càncer (Kroemer 2006; Chen, Russo et al. 2007; Chen, Fang et al. 2007).

La seqüència de DNA mitocondrial presenta llocs d'una alta similitud als HRE, suggerint que les hormones esteroidals podrien produir un efecte directe en la transcripció mitocondrial (Demonacos, Karayanni et al. 1996; Tsiriyotis, Spandidos et al. 1997). Per això, mitjançant prediccions *in silico*, es van determinar possibles llocs d'unió i d'acció de les hormones esteroidals, concretament es van buscar els AREs, en el DNA mitocondrial (taula 21). Un dels possibles llocs d'unió de l'AR era en la seqüència de la COX I, justament la proteïna amb la qual havíem comprovat la colocalització mitocondrial de l'AR en condicions de deprivació. Continuar investigant aquesta localització mitocondrial d'AR en condicions de deprivació hormonal així com la d'altres receptors nuclears és important ja que el genoma mitocondrial podria ser el primer lloc d'acció de les hormones esteroidals i tiroïdals, i els efectes en el genoma mitocondrial podrien ser conseqüència de l'acció directa a través d'un mecanisme similar al mecanisme d'acció de les hormones esteroidals en el genoma nuclear (Ioannou, Tsawdaroglou et al. 1988; Sekeris 1990). Els receptors hormonaals, doncs, estarien presents en la mitocòndria, el receptor seria capaç d'unir-se a les seqüències de DNA mitocondrial

similars a les HRE nuclears i el resultat de la interacció del recetpor amb aquest DNA modularia la transcripció.

Sabem que en presència d'hormones la localització mitocondrial dels RN assegura la coordinació de diversos processos requerint la transcripció de gens en els 2 orgànuls (nucli i mitocòndria) (Scheller and Sekeris 2003). La presència dels receptors esteroidals a la mitocòndria s'ha correlacionat amb un efecte directe de les hormones respectives en la transcripció mitocondrial o apoptosi (Scheller and Sekeris 2003). Els glucocorticoids i els estrògens afecten la producció d'energia en les cèl·lules diana augmentant la disponibilitat dels enzims que participen en la fosforilació oxidativa. En el múscul regulen la transcripció de gens implicats en la fosforilació oxidativa i en la biogènesi mitocondrial (Weber, Bruck et al. 2002). En l'esperma humà s'ha identificat ER $\beta$  i AR de 110 i de 90 KDa en el coll dels espermatozoides (Solakidi, Psarra et al. 2005) i s'ha postulat que podrien tenir un paper en la fertilització i amb la necessitat energètica de la cèl·lula (Diez-Sanchez, Ruiz-Pesini et al. 2003; Diez-Sanchez, Ruiz-Pesini et al. 2003). Les hormones esteroidals i tiroïdals tenen efectes profunds en la biogènesi i en les funcions fisiològiques de la mitocòndria en fetge i múscul (Gustafsson, Tata et al. 1965; Mansour and Nass 1970; Mansour and Nass 1974). A més, s'ha descrit que el tractament hormonal influencia la respiració mitocondrial i la fosforilació oxidativa, la translocació d'ions i el nombre i la mida de les mitocòndries (Wakat and Haynes 1977). Els RN localitzats a nucli i a mitocòndria regulen la transcripció dels gens utilitzant una funció comuna interaccionant amb els llocs d'unió comuns en els dos genomes (Psarra and Sekeris 2008).

A més a més, en el nostre grup hem determinat que en condicions control de les LNCaP, i mitjançant immunoprecipitació, el receptor d'AR interacciona amb la subunitat IV del complex IV (figura 88). Tot i que els problemes tècnics no ens van permetre elucidar si en condicions de deprivació hormonal també obteníem aquesta interacció, ens sembla molt interessant seguir treballant per determinar si existeixen més interaccions proteïna – proteïna, per determinar si la funció dels receptors en condicions de deprivació hormonal és la mateixa que en condicions on les hormones hi són presents, si aquesta funció canvia (acció no genòmica) o s'accentua degut als canvis que es produeixen en la regulació cel·lular, la implicació que pot tenir aquesta localització mitocondrial en malalties que afecten a teixits amb un alt requeriment energètic, com per exemple, al múscul, etc.

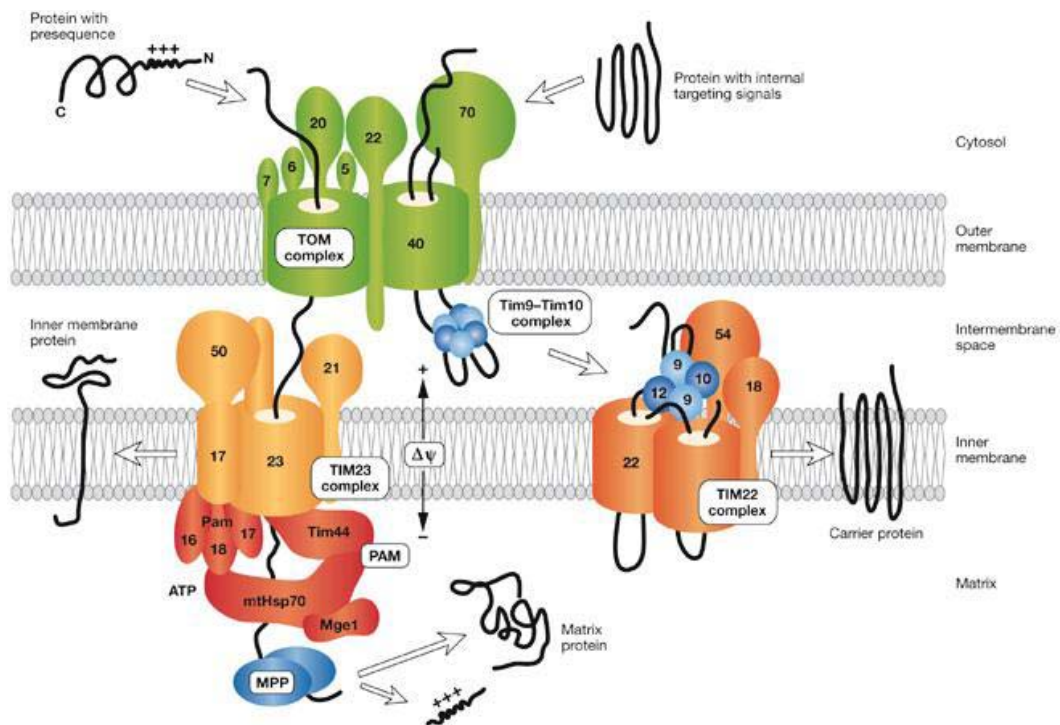
Al DNA mitocondrial també s'han detectat llocs d'unió per a altres factors de transcripció com NF- $\kappa$ B, AP-1, CREB, p53 (Ogita, Okuda et al. 2002; Ogita, Fujinami et al. 2003; Solakidi and Sekeris 2003; Lee, Kim et al. 2005). Concretament, p65 i p50, subunitats de NF- $\kappa$ B, es detecten en mitocòndria de les LNCaP (Guseva, Taghiyev et al. 2004). Aquests TF també tenen un rol en la transcripció mitocondrial i en el metabolisme energètic en relació amb l'apoptosi; en apoptosi, majoritàriament disminueix l'expressió gènica mitocondrial. Els RN i els TF també exerceixen funcions no genòmiques, efectes ràpids i potser algunes accions són importants en la mitocòndria i poden ser similars a les genòmiques (Psarra and Sekeris 2008).

Hem vist que en condicions d'hiperglicèmia el NF- $\kappa$ B regula a l'AR impedint-ne la seva activitat transcripcional. El fet de localitzar a la mitocòndria p65 i p50 obre les portes a nous estudis que intentin explicar el rol (potser garantint la supervivència cel·lular) que juga aquest factor de transcripció en la regulació de l'AR mitocondrial en el tractament de deprivació androgènica en el càncer de pròstata (Guseva, Taghiyev et al. 2004). També seria interessant esbrinar quina relació s'estableix entre la localització mitocondrial d'AR i de NF- $\kappa$ B i el risc de patir càncer de pròstata en pacients diabètics.

La majoria de proteïnes mitocondrials són codificades pel DNA nuclear i importades a la mitocòndria des del citosol. Aquesta translocació a través de les membranes mitocondrials està dirigida per un complex format per subunitats proteïques que funcionen com a translocadors de proteïnes. El complex TOM (de l'anglès *translocase of the outer membrane*) funciona a través de la membrana mitocondrial externa i és requerit per a l'import de les proteïnes mitocondrials codificades pel DNA nuclear. Els dos complexos TIM (de l'anglès *translocase of the inner membrane*) (figura 114), contenen components que actuen de receptors dels precursors proteïcs i components que formen el canal de translocació. TIM23 ajuda a transportar algunes proteïnes a la matriu mitocondrial i n'ajuda a d'altres a insertar-se amb proteïnes que formen part de la membrana mitocondrial interna. TIM22 dirigeix el procés d'inserció de les proteïnes que formen part de la membrana mitocondrial interna (Koehler, Merchant et al. 1999; Tokatlidis 2000; Yano, Hoogenraad et al. 2000; Saitoh, Igura et al. 2007). Per tant, aquest sistema de translocació de proteïnes codificades al genoma nuclear és una altra via a explorar, ja que AR només presenta algun senyal d'importació

mitocondrial a l'extrem N-terminal predit *in silico*. Per tant no es pot descartar una possible funció dels complexos TOM i TIM 23, que s'unirien a l'AR i l'importarien a la mitocòndria.

La xaperona HSP90 contribueix a l'entrega de la proteïna premitocondrial al complex TOM en un procés dependent d'ATP (Young, Hoogenraad et al. 2003). Ja hem descrit a la introducció que l'AR està segregat a citoplasma per un complex de xaperones moleculars, entre elles, HSP90 i HSP70. Quan s'uneix el lligand, aquestes xaperones es dissocien i l'AR es pot translocar a nucli. La interacció AR-HSP90 manté una conformació amb una alta afinitat pel lligand (Fang, Fliss et al. 1996; Solit, Scher et al. 2003). Per tant, en presència d'hormones, HSP90 facilita la unió dels andrògens al seu receptor, permeten que aquesta unió comporti un canvi conformacional, un alliberament de les xaperones i el pas de l'AR del citoplasma a nucli. En condicions de deprivació hormonal, com actua HSP90? Degut a què HSP90 facilita la unió del precursor proteic al complex TOM, podria ser que en condicions on no hi ha lligand d'AR, HSP90 facilités l'entrega del receptor al complex TOM per a què l'importés a la mitocòndria per a dur a terme unes funcions determinades i requerides per la supervivència cel·lular en un ambient deprivat d'hormones (figura 115). Cal, però, realitzar més estudis per acceptar o refusar aquesta hipòtesi.



**Figura 115.** Les dues vies principals d'import de proteïnes a la mitocòndria. Extret de Bolander et al., 2008.

## 5.7 PAPER DE LA HIPERGLICÈMIA I EL TNF $\alpha$ EN EL CÀNCER DE PRÒSTATA

Existeixen diferents estudis, fins i tot un metanàlisi, on es confirma el baix risc de patir càncer de pròstata en pacients diabètics, però cap d'ells no aprofundeix en les causes (Bansal, Bhansali et al. 2012). Per això, un dels objectius d'aquesta tesi era esbrinar les possibles causes que fan que el càncer de pròstata tingui una menor incidència en els individus que pateixen diabetis melitus, analitzant quin o quins són els factors que ofereixen aquesta protecció (la insulina, la glicèmia, citocines i/o el silenciament o la disminució de l'expressió de l'AR) i determinar quina o quines són les vies de senyalització responsables de l'efecte protector de la diabetis en el càncer de pròstata.

Amb els experiments realitzats per aconseguir els objectius plantejats hem obtingut uns resultats que demostren que la hiperglicèmia, tant en la línia cel·lular de càncer de pròstata hormono - dependent LNCaP com en el model animal PAC120 (al qual se li ha induït la DM



amb STZ) és capaç de disminuir l'expressió de l'AR, tant a nivell de mRNA com de proteïna, a través de la via del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) així com provocar un menor creixement del tumor o el no creixement d'aquest (figures 91, 98, 99 i 100; taula 22). Aquest efecte en el creixement tumoral queda revertit en els animals diabètics quan s'utilitza un inhibidor de la via NF- $\kappa$ B, el QNZ (figura 101). En les pròstates endògenes d'aquests animals també es va detectar una reducció significant en l'expressió d'AR (figura 108). Hem descartat que la disminució de l'AR sigui deguda a un efecte osmòtic per l'augment de la concentració de la D-glucosa en el cultiu (figura 92), per una transició epiteli-mesènquima de les LNCaP o per una transformació neuroendocrina d'aquestes. També es va descartar que la necrosi i/o apoptosi de les cèl·lules tumorals epitelials fos deguda a un efecte tòxic de la STZ en aquestes cèl·lules, tal i com els hi passa a les cèl·lules  $\beta$  pancreàtiques (figura 95).

La literatura destaca la susceptibilitat genètica, els nivells baixos d'insulina, IGF-1 i la testosterona (T) entre els factors proposats com a protectors del risc de patir càncer de pròstata en la DM2. Però dos elements essencials en la DM2, la hiperglicèmia i l'augment de les citokines pro inflamatòries (TNF $\alpha$ ) no s'havien examinat mai abans, en el càncer de pròstata.

Com ja hem comentat abans, la via de senyalització de l'AR té un paper molt important en la integritat estructural i funcional de la pròstata així com també en el creixement i progressió del càncer de pròstata (Grossmann and Wittert 2012). S'ha demostrat que el bloqueig o silenciament de l'AR porta a la inhibició del creixement i a l'apoptosi de les cèl·lules de càncer de pròstata androgen dependents i androgen independents (Eder, Culig et al. 2000; Zegarra-Moro, Schmidt et al. 2002; Liao, Wang et al. 2005). No obstant, l'efecte de la diabetis en l'AR i en el creixement tumoral no s'havia explorat fins ara. Amb els nostres resultats és la primera vegada on es mostra que la hiperglicèmia disminueix l'AR a través de l'activació de NF- $\kappa$ B, i que l'efecte inhibitori s'incrementa amb el TNF $\alpha$ . En la regió reguladora de l'AR humà es van identificar 8 possibles llocs d'unió consens per NF- $\kappa$ B en les 3,6 kb situades a l'extrem 5' del TSS (Zhang, Charron et al. 2004; Zhang, Lanter et al. 2009) i l'Ar murí presenta almenys un lloc d'unió per NF- $\kappa$ B on un cop unit disminueix la transcripció d'AR (Supakar, Jung et al. 1995).

El càncer de pròstata presenta una relació amb l'envelliment i els factors genètics només expliquen el 42% del risc (Grossmann and Wittert 2012). Alguns factors com TCF-2 i les seves variants, associades a la DM2 participen en aquest baix risc de patir càncer de pròstata observat a la DM2 (Olson, Callas et al.), però la relació temporal entre el càncer de pròstata i la DM2 (el risc disminueix com més temps fa del diagnòstic de la DM2), va en contra d'aquest concepte (Kasper, Liu et al. 2009). En concordança amb la idea de què a més temps de patir DM menys risc de càncer de pròstata, nosaltres hem observat més disminució del creixement tumoral del xenograft en el grup de ratolins als quals se'ls hi havia induït la diabetis abans de la implantació tumoral.

Tot i que en els nostres resultats no hem observat un paper clau de la insulina en la prevenció del càncer de pròstata, alguns estudis prospectius demostren que hi podria haver una relació entre la hiperinsulinèmia i el càncer de pròstata ja que els homes amb nivells baixos d'insulina deguts a la diabetis sembla que presentin menys risc de desenvolupar càncer de pròstata (Hsing, Sakoda et al. 2007; Kasper, Liu et al. 2008). Però altres no donen suport a aquest rol de la insulina en el risc de patir càncer de pròstata (Kasper, Liu et al. 2008; Grossmann and Wittert 2012). La insulina és un factor de creixement per a l'epiteli prostàtic i també estimula el creixement d'una línia cel·lular de rata de càncer de pròstata (Polychronakos, Janthly et al. 1991). Això suggereix que la insulina podria promoure directament la proliferació de les cèl·lules del càncer de pròstata. No obstant, aquestes observacions estan basades en un model experimental de càncer de pròstata resistent a la castració (no en un càncer de pròstata dependent d'hormones) i l'efecte de la insulina en el procés de tumorigènesi en fases primerenques no està clar. A més, les dosis d'insulina utilitzades en l'assaig estaven per sobre de les dosis fisiològiques (Grossmann and Wittert 2012).

Malgrat les controvèrsies sorgides en diferents estudis, sembla ser que la deprivació d'insulina que té lloc a mesura que avança la diabetis limita l'acció d'aquesta i per tant protegeix contra el càncer de pròstata, ja que a l'epiteli prostàtic li faltaria aquest factor de creixement. De fet, els nivells baixos d'insulina poden ser un factor que contribueix en el poc creixement tumoral en els PACs 120 tractats amb STZ.

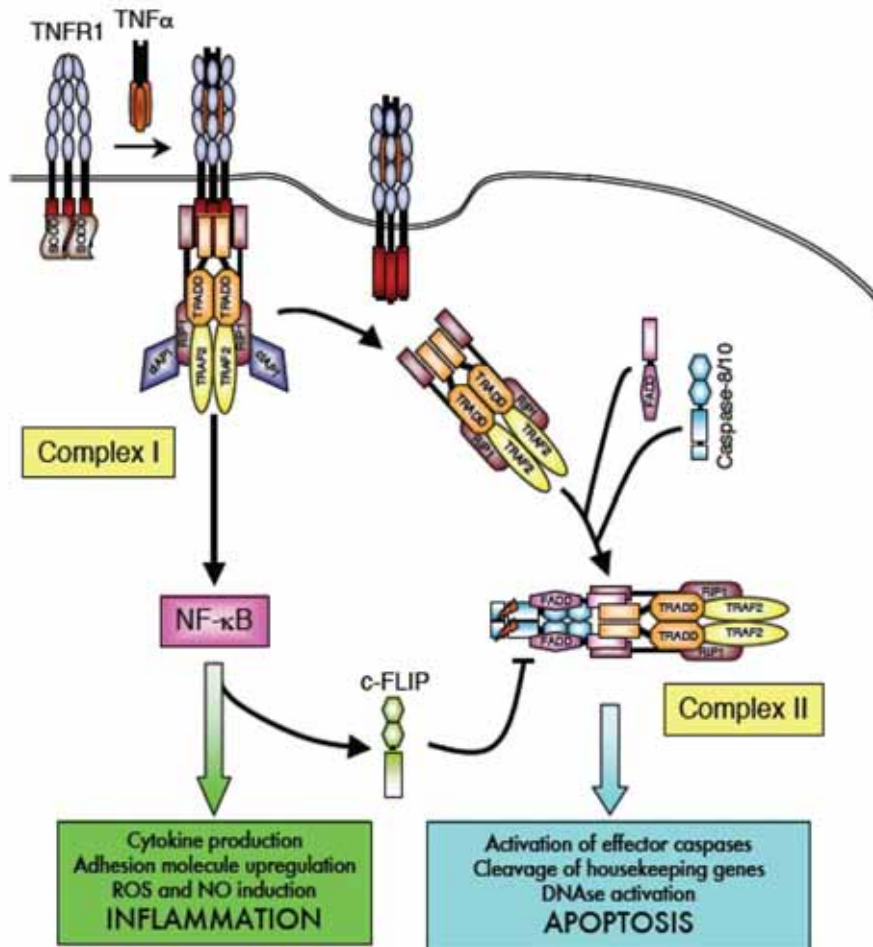
Una possible hipòtesi de com la hipoinsulinèmia podria disminuir el risc de patir càncer de pròstata és limitant la biodisponibilitat de IGF-1 (Grossmann and Wittert 2012), ja que més IGF-1 pot promoure proliferació de les cèl·lules epitelials de la pròstata, però alguns estudis recents suggereixen que els nivells de IGF-1 no són significativament diferents entre individus diabètics i individus controls (Chen, Lewis et al. 2005; Kasper, Liu et al. 2008). Tot i això, la relació IGF-1 i càncer de pròstata en la DM2 és especulativa.

Com que el càncer de pròstata és androgen dependent, és possible que els nivells baixos de T presents en la diabetis de llarga durada (especialment en obesos) puguin aconseguir baix risc de patir càncer de pròstata (Kasper, Liu et al. 2009; Grossmann and Wittert 2012). Però els nivells de T en sèrum són poc significatius per utilitzar-los com a fenotip clínic, ja que els nivells circulants de T, lliure i total, no reflecteixen l'acció dels andrògens en els teixits. Alguna evidència suggereix que els baixos nivells de T circulant poden ser un risc per l'agressivitat del tumor (Goldenberg, Koupparis et al. 2011; Morgentaler 2011), i aquesta podria ser una de les raons per les quals quan apareix el càncer de pròstata en la DM2 té un pitjor pronòstic (Morgentaler 2011; Grossmann and Wittert 2012).

Un estudi experimental recent al·lega esteroidogènesi intracel·lular *de novo* en el càncer de pròstata, promoguda per la insulina (Lubik, Gunter et al. 2011), però no analitzen l'efecte en l'AR.

Un augment de  $TNF\alpha$  és un dels constituents del procés inflamatori de baix grau característic de la DM2 i podria ser un factor clau per disminuir el risc del càncer de pròstata en DM2 en comparació amb la DM1. El  $TNF\alpha$  el produeixen principalment cèl·lules del sistema immune, però també altres tipus cel·lulars, incloent les cèl·lules epitelials del càncer de pròstata humà (Mizokami, Gotoh et al. 2000).  $TNF\alpha$  s'uneix al receptor de  $TNF\alpha$  (TNFR1) (figura 116), l'activació del receptor produeix la fosforilació i la degradació de I $\kappa$ Ba provocant la dissociació del complex I $\kappa$ Ba – NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ Ba inhibeix l'activació de NF- $\kappa$ B) i a la degradació de I $\kappa$ Ba pel proteasoma (Ko, Shi et al. 2008; Wang, Montgomery et al. 2009). La degradació de I $\kappa$ B resulta en l'alliberament de NF- $\kappa$ B, que es transloca a nucli. Així regula la transcripció dels gens diana (entre ells inhibidors de les caspases), promovent la proliferació cel·lular, l'apoptosi o la resposta inflamatòria (Van Antwerp, Martin et al. 1996). En la línia LNCaP, fins i tot quan NF- $\kappa$ B està activat,  $TNF\alpha$  pot induir la mort cel·lular de manera dosi-dependent

(Chopra, Menard et al. 2004). Aquesta discrepància s'explica per la regulació negativa d'AR a través de NF- $\kappa$ B (Supakar, Jung et al. 1995; Ko, Shi et al. 2008). Amb inhibidors de NF- $\kappa$ B, concretament amb el QNZ, la disminució de l'expressió de l'AR es bloqueja, posant en relleu el rol central de NF- $\kappa$ B en la prevenció del desenvolupament del càncer de pròstata en la DM2.



**Figura 116.** Esquema de la senyalització del receptor 1 del TNF $\alpha$  (TNFR1). Extret de Kimberley *et al.* 2007.

S'haurien de fer dues consideracions en el potencial rol preventiu del TNF $\alpha$  en el desenvolupament del càncer de pròstata: 1) TNF $\alpha$  disminueix els nivells de SHBG (Meyer, Robsahm et al.; Simo, Barbosa-Desongles et al.) 2012; i pot tenir un efecte directe en la disminució de l'AR via NF- $\kappa$ B i un efecte indirecte reduint la T en sèrum, i 2) també pot

inhibir la síntesi d'hormona en les cèl·lules de Leydig (Hales 2002) i estimular l'activitat aromatasa, l'enzim que converteix la T en estradiol, la qual cosa explicaria els nivells baixos de T en la DM2.

Els nostres estudis suggereixen que la hiperglicèmia i el TNF $\alpha$  juguen un paper important en protegir als pacients amb DM2 del risc de patir càncer de pròstata, reduint els nivells d'AR via l'activació de NF- $\kappa$ B. Tot i que en la literatura hi ha diversos treballs que demostren que NF- $\kappa$ B inhibeix l'expressió d'AR (Mizokami and Chang 1994; Supakar, Jung et al. 1995; Grad, Dai et al. 1999; Song, Jung et al. 1999; Zhang, Altuwajri et al. 2009), en un estudi realitzat per Zhang i col·laboradors l'any 2009 van obtenir resultats oposats als nostres i als publicats anteriorment en la literatura (activació de NF- $\kappa$ B s'observava en les línies cel·lulars de càncer de pròstata PC3 i DU-145 que no expressen l'AR de 110 kDa). Aquests investigadors correlacionaven l'expressió de NF- $\kappa$ B en el càncer de pròstata amb l'augment dels nivells de mRNA i de proteïna d'AR de 110KDa, amb l'activitat de transactivació de l'AR i amb la proliferació cel·lular (Zhang, Lanter et al. 2009). No obstant, en aquest treball no van tenir en compte la patologia de la diabetis en el càncer de pròstata i observen que quan enlloc de formar-se un dímer de p65 o un heterodímer amb les subunitats p65 i p50 (que activarien el promotor d'AR) es forma un homodímer de subunitats p50, inhibeix lleugerament l'activació del promotor (Zhang, Lanter et al. 2009). Aquest resultat és molt interessant i s'hauria de continuar explorant per entendre millor el paper de les diferents subunitats de NF- $\kappa$ B i la funció i/o importància dels 8 putatius llocs d'unió per aquest factor de transcripció en el promotor de l'AR humà en la patologia prostàtica en pacients diabètics i no diabètics.

Altres vies alternatives amb mecanismes de l'activació de NF- $\kappa$ B com AGEs o l'estrès oxidatiu, també involucrats en baix risc de patir càncer de pròstata observat en la DM2 haurien de ser objecte d'estudi.

El segell distintiu de la DM és la hiperglicèmia, que pot ser controlada per l'administració d'insulina externa o amb altres fàrmacs que en provoquen la secreció. Una de les vàries complicacions que donen els nivells elevats de glucosa en sang és l'oxidació de proteïnes i lípids i la glicació irreversible, donant lloc a la formació de productes finals de la glicació (de l'anglès, AGE) que poden tenir una acció patològica. La formació d'AGE és un procés que es dona amb l'edat i s'accelera en la DM (Singh, Barden et al. 2001). Les proteïnes glicades

pateixen canvis estructurals i fins i tot perden la seva funció. Els AGEs exerceixen part de la seva funció a través dels receptors AGE (RAGE), que també uneixen membres de la família S100/calgranulina. Algunes d'aquestes molècules induïxen inflamació i migració cel·lular (Yan, Ramasamy et al. 2010). RAGE activa membres de la família de les MAPK (Taguchi, Blood et al. 2000), incloent p44/42, JNK, p38 i Jak/STAT (Huang, Guh et al. 2001), Akt (Toure, Fritz et al. 2012). Aquestes vies de senyalització convergeixen en molts factors de transcripció com Egr-1 (Chang, Wendt et al. 2008), NF- $\kappa$ B (Huttunen, Fages et al. 1999) i Sp1 (Li, Qu et al. 1998). Aquesta unió provoca estrès oxidatiu (Lander, Tauras et al. 1997), es genera ROS intracel·lular i la subseqüent activació del factor de transcripció sensible a REDOX NF- $\kappa$ B en les cèl·lules de les parets vasculares (Tanaka, Yonekura et al. 2000) (figura 117).

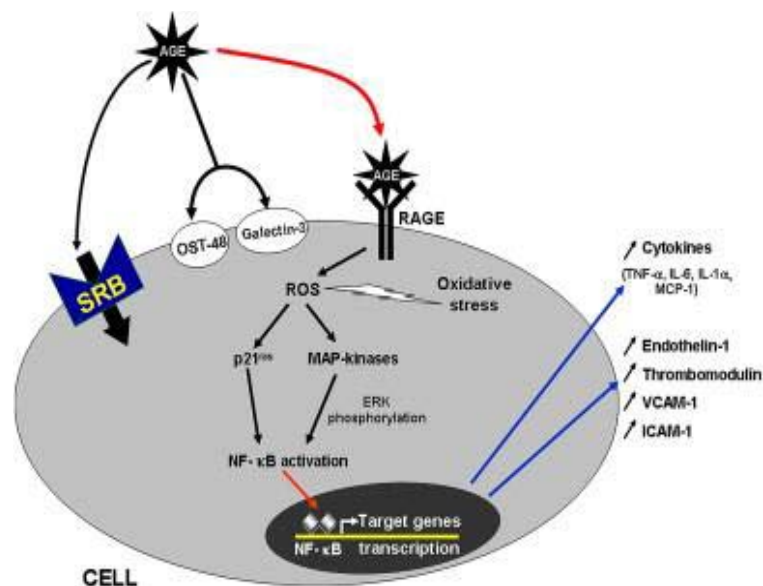


Figura 117. Via senyalització dels AGEs a través del RAGE. Extret de Rondeau i Bourdon, 2011

L'envelliment és important per al desenvolupament del càncer de pròstata i per produir AGEs, i RAGE té un rol en la metastasi i/o invasió en alguns càncers. En diferents càncers, incloent mama (Hsieh, Schafer et al. 2003), colon (Kuniyasu, Ohmori et al. 2003), colorectal (Kuniyasu, Ohmori et al. 2003), pròstata (Ishiguro, Nakaigawa et al. 2005), pàncrees (Kang, Tang et al. 2010), limfoma (Hsieh, Schafer et al. 2003) i melanoma (Leclerc, Heizmann et al. 2009) hi ha sobreexpressió de RAGE. MMP-2, MMP-9 i MAPK, importants per al creixement, invasió i metastasi del càncer són controlades mitjançant la senyalització de RAGE (Kuniyasu,

Que et al. 2002). S'ha demostrat també que el bloqueig del RAGE inhibia el creixement i la metàstasi de les cèl·lules de glioma (Taguchi, Blood et al. 2000). L'augment d'expressió de RAGE indueix creixement i invasió del PCa perquè està augmentat en aquest tipus de tumor. En la línia de càncer de pròstata hormono independent DU145 s'han observats augmentats els nivells de mRNA de RAGE respecte les altres línies cel·lulars hormonodependents o el propi teixit de pròstata, així com també les MMPs i més activació de p44/42 (Ishiguro, Nakaigawa et al. 2005). La interacció AGE-RAGE indueix citoqueratines com IL-6 i altres factors de creixement. La progressió del càncer de pròstata s'accelera amb les citocines, els factors de creixement o l'activació de MAPK (Djakiew 2000).

La interacció AGE-RAGE és essencial pel desenvolupament del càncer de pròstata (Ishiguro, Nakaigawa et al. 2005), però el significat biològic i terapèutic està per esbrinar. El silenciament de RAGE produeix apoptosi induïda per l'augment de l'expressió de TRAIL i evitant unió HMGB1-RAGE (HMGB1 és un lligand de RAGE sobreexpressat en càncer de pròstata, i el seu silenciament redueix la viabilitat de les cèl·lules tumorals perquè indueixen apoptosi (Gnanasekar, Thirugnanam et al. 2009). Els tumors de pròstata no tractats o els hormono refractaris tenen els nivells de mRNA de RAGE augmentats en comparació amb la pròstata normal (Ishiguro, Nakaigawa et al. 2005). La disminució de RAGE provoca inhibició de la proliferació cel·lular, activació de l'apoptosi i la supressió del creixement tumoral *in vivo*. A més, prevé la proliferació del PCa induïda per HMGB1-RAGE. Si es disminueix l'expressió de RAGE, es redueix el PSA [proteïna utilitzada pel monitoratge del progrés del tumor de pròstata (Williams, Jelinek et al.; Lilja, Ulmert et al. 2008) 2011 en LNCaP. La disminució de RAGE redueix els nivells de PSA, per tant, millora la prognosi i hi ha avantatge en la supervivència dels pacients amb càncer de pròstata.

Sembla ser que l'augment d'AGEs degut a la DM podria augmentar la via de NF- $\kappa$ B disminuint així els nivells de l'AR i protegint del risc de patir càncer de pròstata, essent un altre possible factor protector. Però aquest fet està en controvèrsia amb els resultats trobats amb AGE/RAGE en el càncer de pròstata, ja que aquests indiquen una expressió de RAGE (receptors a través dels qual els AGE exerceixen el seu efecte) augmentada en els tumors de pròstata, conferint-los-hi més agressivitat i capacitat invasiva. Al disminuir els nivells de mRNA de RAGE també es disminueixen els de PSA, indicant així que RAGE juga un paper important en el progrés de la malaltia. Per tant, són necessaris més estudis en aquest camp,

sobretot tenint en compte que RAGE és un membre de la superfamília de les immunoglobulines l'expressió de la qual és controlada per NF- $\kappa$ B (Tanaka, Yonekura et al. 2000). A més, en aquest estudi de RAGE i càncer de pròstata el factor de la diabetis no es tenia en compte.

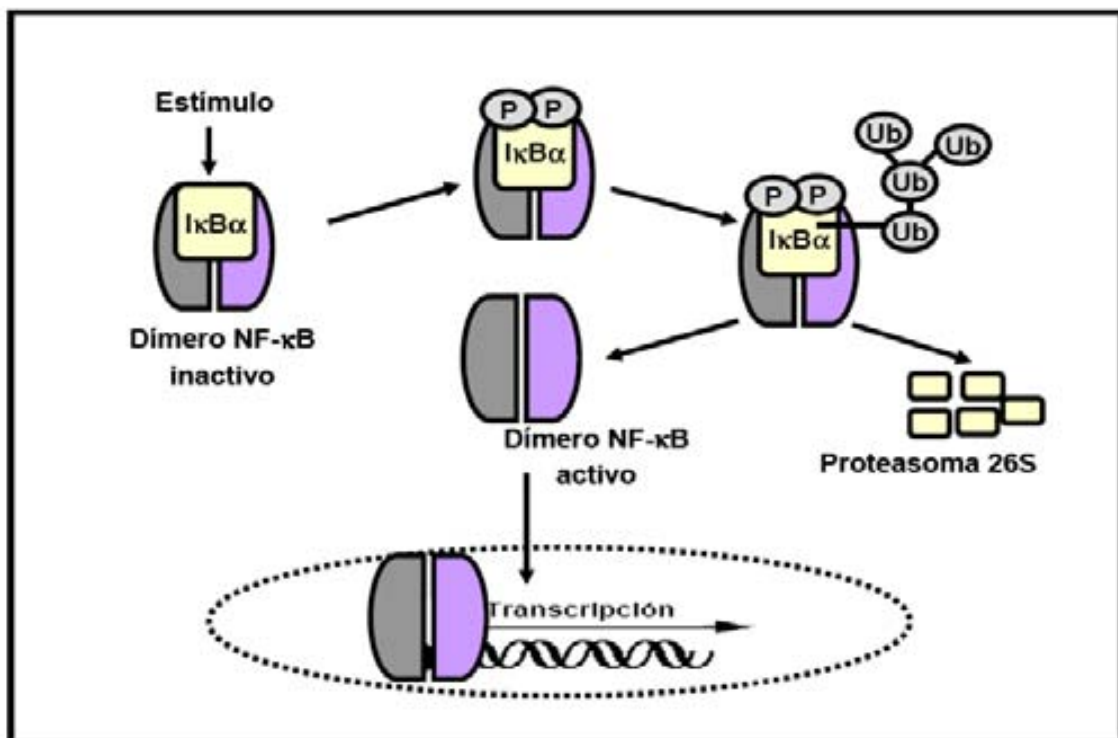
Molts tumors sòlids presenten activitat constitutiva de NF- $\kappa$ B (Karin, Cao et al. 2002). Aquesta activació pot ser resultat o bé de l'exposició a estímuls proinflamatoris en el microambient tumoral o una mutació en els components que regulen la via de senyalització IKK–NF- $\kappa$ B (Karin, Cao et al. 2002) (figura 118). NF- $\kappa$ B és un membre de la família dels TF format per homo o heterodímers identificats per primer cop com a activadors de la cadena lleugera  $\kappa$  de les immunoglobulines dels limfòcits B (Sen and Baltimore 1986; Sen and Baltimore 1986). En mamífers s'han identificat 5 subunitats (p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105, p52/p100). Els dímers de NF- $\kappa$ B són retinguts al citoplasma per proteïnes inhibidores de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B). Aquestes són fosforilades per les Ikk quinases i es dissocien de les subunitats de NF- $\kappa$ B. Llavors aquest es transloca a nucli i regula l'expressió dels gens juntament amb la interacció dels elements activadors  $\kappa$ B (Perkins 2000). NF- $\kappa$ B és un element important de la biologia clínica del càncer de pròstata ja que inhibeix l'apoptosi (Beg and Baltimore 1996; Liu, Corey et al. 1996; Van Antwerp, Martin et al. 1996; Wang, Mayo et al. 1996), facilita la supervivència de les cèl·lules del càncer de pròstata (Zhang, Lanter et al. 2009), estimula la proliferació cel·lular (Joyce, Albanese et al. 2001) i promou el fenotip migratori i invasor associat a la progressió del tumor. A més a més s'ha descrit que NF- $\kappa$ B/p65 està sobreexpressat en PIN i en càncer comparat amb l'epiteli benigne (Sweeney, Li et al. 2004). Normalment està activat en adenocarcinoma prostàtic i la seva expressió es relaciona amb progressió (Fradet, Lessard et al. 2004; Ross, Kallakury et al. 2004; Shukla, MacLennan et al. 2004; Sweeney, Li et al. 2004). NF- $\kappa$ B està constitutivament activat en el càncer de pròstata androgenindependent (Gasparian, Yao et al. 2002) i xenograft de tumors resistents a la castració (Chen and Sawyers 2002; Chen, Welsbie et al. 2004). S'ha vist que NF- $\kappa$ B regula la transcripció d'AR en cèl·lules de Sertoli de rata (Zhang, Charron et al. 2004), i també en regula l'expressió, l'activitat i la proliferació en el càncer de pròstata humà.

La correlació entre la sobreexpressió de NF- $\kappa$ B i la progressió del tumor de pròstata no la podem fer en els pacients diabètics que pateixen aquest tipus de càncer ja que sembla que



els hi oferiria un millor pronòstic. Per això cal continuar fent estudis per esbrinar el mecanisme de regulació diferencial de NF- $\kappa$ B.

En el cas del càncer de pròstata, la inflamació associada al tumor és part de la progressió normal, però pot ser promoguda i accelerada com a resultat de la teràpia de deprivació. És possible que la resposta inflamatòria associada a tumor provoqui la mort per necrosi de les cèl·lules malignes, com a resultat de la hipòxia en la progressió normal del tumor o de la intervenció terapèutica. NF- $\kappa$ B regula la citoquina IL-6 (Karin 2009).



**Figura 118.** Esquema de l'activació de la via de NF- $\kappa$ B mitjançant l'alliberament del dímer NF- $\kappa$ B de l'inhibidor I $\kappa$ B. Extret de la tesi doctoral Dra Stefka Mincheva.

S'ha descrit que la DM causa regressió de la pròstata en rates i disminueix la testosterona en sèrum degut a l'alteració de l'eix hipotàlam-pituitari-gonadal. El factor de creixement transformant (de l'anglès *transforming growth factor*-beta) o TGF $\beta$ 1 i TGF $\beta$ 2 hi podrien tenir un paper ja que TGF $\beta$  és un inhibidor del creixement cel·lular prostàtic. La família del TGF $\beta$  regula la proliferació, aturada en creixement, diferenciació i apoptosi de la cèl·lules epitelials i estromals de la pròstata (Ikeda, Wada et al. 2000).

Els mRNAs de TGF $\beta$ 1 i 2 estan augmentats en la pròstata de la rata diabètica; al tractar les rates amb insulina els nivells disminueixen (Kyprianou and Isaacs 1989; Hsing, Kadomatsu et al. 1996) i es restaura l'efecte complet de la T (Martikainen, Makela et al. 1987; Nevalainen, Valve et al. 1991). TGF $\beta$  està sobreexpressat en el càncer de pròstata avançat i té acció en estroma via dependent i independent de SMAD2 (Coffey, Shipley et al. 1986; Roberts and Essenhight 1986; Zhu and Kyprianou 2005). La interacció entre AR i SMAD3 provoca repressió de l'AR (Hayes, Zarnegar et al. 2001). SMAD4 (unit o no a SMAD3) interacciona amb AR en BDB i LBD i modula la transactivació d'AR induïda per DHT (Zhou, Chen et al. 2008).

Molts estudis han investigat un possible nexa entre l'obesitat, el metabolisme energètic, el balanç nutritiu i les modificacions epigenètiques (Milagro, Campion et al. 2009; Tateishi, Okada et al. 2009).

L'obesitat s'associa amb la pèrdua de funció de la histona demetilasa, Jhdm2a, resultant en una disminució de l'expressió de PPAR- $\gamma$  en múscul esquelètic (Tateishi, Okada et al. 2009). NF- $\kappa$ B és un dels TF predominant de la via inflamatòria activat en diabetis. Poc control glicèmic l'augmenta en monòcits i augmenta l'expressió de citocines inflamatòries (Hofmann, Schiekofer et al. 1998; Shanmugam, Reddy et al. 2003). En cèl·lules de ronyó humanes s'ha demostrat Set7 en la metilació de lisines del p65 NF- $\kappa$ B en resposta a TNF $\alpha$  (Li, Reddy et al. 2008). Això implica una interacció entre NF- $\kappa$ B i les HATs, resultant en una hiperacetilació de gens diana, incloent el promotor de TNF $\alpha$  i de la ciclooxigenasa 2 (Miao and Natarajan 2005). L'estrès oxidatiu induït per hiperglicèmia i la formació d'AGEs porta a l'alliberament de citocines, molècules d'adhesió cel·lular i la modificació de gens de la matriu extracel·lular que faciliten l'activació de limfòcits i la invasió (Brownlee 2001; Libby and Plutzky 2002; Hansson 2005; Dragomir and Simionescu 2006). S'ha estudiat molt el rol epigenètic en la patologia cardiovascular de la diabetis, però territori inexplorat per noves teràpies, tot i que els inhibidors de les HDACs es podrien utilitzar com a possible tractament a les complicacions derivades de la DM2 (Bieliauskas and Pflum 2008; Haberland, Mokalled et al. 2009; Szyf 2009; Szyf 2009).



## 6.CONCLUSIONS

---



6.1 En l'espècie humana, el gen d'AR presenta, com a mínim, 5 primers exons alternatius que donen lloc a un mínim de 5 unitats de transcripció, que s'inicien, respectivament, amb l'exó 1A, 1B, 1C, 1D i 1E.

6.2 L'exó 1C, 1D i 1E del gen d'AR en l'espècie humana són primers exons alternatius no descrits prèviament. No presenten un codó d'inici de la traducció i s'enllacen directament amb l'exó 2 utilitzant els 5' i 3' *splice sites* consens.

6.3 Els exons 1C, 1D i 1E actuen com a seqüències 5' UTR que podrien modular els nivells de traducció dels seus mRNAs.

6.4 Els trànscrits iniciats pels exons 1C, 1D i 1E presenten una pauta de lectura comuna i que donaria lloc a una proteïna de 35 KDa, aproximadament.

6.5 Les 5 unitats de transcripció d'AR s'expressen tant en línies cel·lulars prostàtiques, no prostàtiques com en mostres de teixits (testicle, pròstata, múscul fetal, cervell, ronyó, placenta, fetge adult i fetge fetal).

6.6 Existeix una alta homologia de seqüència dels primers exons 1C, 1D i 1E d'AR en les 3 espècies de primats analitzades i en *Bos taurus*. Per a la resta d'espècies de mamífers i no mamífers comparades no s'han pogut identificar aquests exons.

6.7 Els nivells de mRNA i de proteïna del receptor d'andrògens disminueixen en la línia cel·lular de càncer de pròstata LNCaP crescuda en condicions de deprivació hormonal. El tractament amb l'agent desmetilant 5-aza-2-deoxicitidina recupera els nivells de mRNA i de proteïna.

6.8 La castració química amb FE200486 en animals portadors del xenograft de càncer de pròstata humà (PAC120) provoca una disminució del volum del tumor així com un retard en el creixement tumoral. Aquests tumors presenten una disminució dels nivells de mRNA i de proteïna d'AR total.

6.9 La deprivació hormonal no provoca metilació en el promotor d'AR 1A en les LNCaP crescudes durant 72 hores en condicions de deprivació hormonal, però sí que la provoca en els tumors provinents dels animals castrats químicament de manera constant.

6.10 La proteïna del receptor d'andrògens es localitza majoritàriament en el nucli en les cèl·lules de càncer de pròstata hormonodepenent en presència d'hormones del sèrum, i al citoplasma en absència d'aquestes hormones. La localització del receptor d'andrògens és principalment mitocondrial en la línia cel·lular hormonodepenent deprivada d'hormones, en les línies hormonoindependents i en el model animal (*xenograft*) de càncer de pròstata PAC120 castrat quirúrgicament.

6.11 El receptor d'andrògens coimmunoprecipita amb la subunitat IV del complex IV de la cadena respiratòria mitocondrial en la línia de càncer de pròstata hormonodepenent.

6.12 L'augment de concentració de glucosa en el medi cel·lular disminueix els nivells de mRNA i de proteïna del receptor d'andrògens en les LNCaP sense canviar la seva morfologia.

6.13 La diabetis induïda amb estreptozotocina produeix un retard en el creixement de tumor de pròstata, redueix els nivells de mRNA del receptor d'andrògens i del PSA, i disminueix el marcatge nuclear d'AR en els tumors i en les pròstates endògenes en el model animal PAC120.

6.14 La disminució de l'expressió del mRNA del receptor d'andrògens, del mRNA del PSA i de la proteïna del receptor d'andrògens és deguda a un efecte sinèrgic entre la hiperglicèmia i el tractament amb  $TNF\alpha$ .

6.15 La hiperglicèmia redueix els nivells d'AR a través de l'activació de  $NF-\kappa B$  en el model cel·lular i en el model animal. El tractament amb un inhibidor de  $NF-\kappa B$ , el QNZ, evita la reducció dels nivells de l'AR en la línia LNCaP i no provoca l'aturada del creixement tumoral en el model PAC120.





## 7.BIBLIOGRAFIA

---



- (1978). "IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: some N-nitroso compounds." IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Man **17**: 1-349.
- Aaronson, D. S., M. Muller, et al. (2007). "An androgen-IL-6-Stat3 autocrine loop re-routes EGF signal in prostate cancer cells." Mol Cell Endocrinol **270**(1-2): 50-6.
- Abate-Shen, C. and M. M. Shen (2000). "Molecular genetics of prostate cancer." Genes Dev **14**(19): 2410-34.
- Adams, M. D., S. E. Celniker, et al. (2000). "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*." Science **287**(5461): 2185-95.
- Ahrens-Fath, I., O. Politz, et al. (2005). "Androgen receptor function is modulated by the tissue-specific AR45 variant." Febs J **272**(1): 74-84.
- Alberti, G. (1999). "A desktop guide to Type 2 diabetes mellitus. European Diabetes Policy Group 1998-1999 International Diabetes Federation European Region." Exp Clin Endocrinol Diabetes **107**(7): 390-420.
- Alilat, M., A. Sivolob, et al. (1999). "Nucleosome dynamics. Protein and DNA contributions in the chiral transition of the tetrasome, the histone (H3-H4)<sub>2</sub> tetramer-DNA particle." J Mol Biol **291**(4): 815-41.
- Andersson, R., S. Enroth, et al. (2009). "Nucleosomes are well positioned in exons and carry characteristic histone modifications." Genome Res **19**(10): 1732-41.
- Antequera, F., J. Boyes, et al. (1990). "High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines." Cell **62**(3): 503-14.
- Araki, S., Y. Omori, et al. (2007). "Interleukin-8 is a molecular determinant of androgen independence and progression in prostate cancer." Cancer Res **67**(14): 6854-62.
- Araud, T., R. Genolet, et al. (2007). "Alternatively spliced isoforms of the human elk-1 mRNA within the 5' UTR: implications for ELK-1 expression." Nucleic Acids Res **35**(14): 4649-63.
- Ast, G. (2004). "How did alternative splicing evolve?" Nat Rev Genet **5**(10): 773-82.
- Ayoubi, T. A. and W. J. Van De Ven (1996). "Regulation of gene expression by alternative promoters." Faseb J **10**(4): 453-60.
- Babendure, J. R., J. L. Babendure, et al. (2006). "Control of mammalian translation by mRNA structure near caps." Rna **12**(5): 851-61.

- Back, M. F., E. L. Ang, et al. (2007). "Improvements in quality of care resulting from a formal multidisciplinary tumour clinic in the management of high-grade glioma." Ann Acad Med Singapore **36**(5): 347-51.
- Bansal, D., A. Bhansali, et al. (2012). "Type 2 diabetes and risk of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies." Prostate Cancer Prostatic Dis.
- Baron, S., M. Manin, et al. (2004). "Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells." J Biol Chem **279**(15): 14579-86.
- Barski, A., S. Cuddapah, et al. (2007). "High-resolution profiling of histone methylations in the human genome." Cell **129**(4): 823-37.
- Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." Cell **136**(2): 215-33.
- Bartlett, J. M., D. Brawley, et al. (2005). "Type I receptor tyrosine kinases are associated with hormone escape in prostate cancer." J Pathol **205**(4): 522-9.
- Bauer, M. F., S. Hofmann, et al. (2000). "Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes." Trends Cell Biol **10**(1): 25-31.
- Beaudoing, E., S. Freier, et al. (2000). "Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes." Genome Res **10**(7): 1001-10.
- Beg, A. A. and D. Baltimore (1996). "An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death." Science **274**(5288): 782-4.
- Bennett, N. C., R. A. Gardiner, et al. (2010). "Molecular cell biology of androgen receptor signalling." Int J Biochem Cell Biol **42**(6): 813-27.
- Berchem, G. J., M. Bosseler, et al. (1995). "Androgens induce resistance to bcl-2-mediated apoptosis in LNCaP prostate cancer cells." Cancer Res **55**(4): 735-8.
- Berdasco, M. and M. Esteller "Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry." Dev Cell **19**(5): 698-711.
- Berman, B. P., D. J. Weisenberger, et al. (2012). "Regions of focal DNA hypermethylation and long-range hypomethylation in colorectal cancer coincide with nuclear lamina-associated domains." Nat Genet **44**(1): 40-6.
- Bernstein, B. E., M. Kamal, et al. (2005). "Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse." Cell **120**(2): 169-81.

- Betancourt-Albrecht, M. and G. R. Cunningham (2003). "Hypogonadism and diabetes." Int J Impot Res **15 Suppl 4**: S14-20.
- Biddie, S. C. and S. L. Lightman (2011). "Epigenetics: a lasting impression?" J Neuroendocrinol **23**(2): 194-5.
- Bieliauskas, A. V. and M. K. Pflum (2008). "Isoform-selective histone deacetylase inhibitors." Chem Soc Rev **37**(7): 1402-13.
- Bird, A. P. and A. P. Wolffe (1999). "Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin." Cell **99**(5): 451-4.
- Bourdon, J. C., K. Fernandes, et al. (2005). "p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity." Genes Dev **19**(18): 2122-37.
- Bourguet, W., V. Vivat, et al. (2000). "Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains." Mol Cell **5**(2): 289-98.
- Brett, D., J. Hanke, et al. (2000). "EST comparison indicates 38% of human mRNAs contain possible alternative splice forms." FEBS Lett **474**(1): 83-6.
- Brinkmann, A. O. "Molecular mechanisms of androgen action--a historical perspective." Methods Mol Biol **776**: 3-24.
- Brown, C. J., S. J. Goss, et al. (1989). "Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism." Am J Hum Genet **44**(2): 264-9.
- Brownlee, M. (2001). "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications." Nature **414**(6865): 813-20.
- Buchanan, G., M. Yang, et al. (2001). "Mutations at the boundary of the hinge and ligand binding domain of the androgen receptor confer increased transactivation function." Mol Endocrinol **15**(1): 46-56.
- Burley, S. K. and R. G. Roeder (1996). "Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID)." Annu Rev Biochem **65**: 769-99.
- Caceres, J. F. and A. R. Kornblihtt (2002). "Alternative splicing: multiple control mechanisms and involvement in human disease." Trends Genet **18**(4): 186-93.
- Calton, B. A., S. C. Chang, et al. (2007). "History of diabetes mellitus and subsequent prostate cancer risk in the NIH-AARP Diet and Health Study." Cancer Causes Control **18**(5): 493-503.

- Callewaert, L., N. Van Tilborgh, et al. (2006). "Interplay between two hormone-independent activation domains in the androgen receptor." Cancer Res **66**(1): 543-53.
- Cameron, E. E., K. E. Bachman, et al. (1999). "Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer." Nat Genet **21**(1): 103-7.
- Cao-Lei, L., S. C. Leija, et al. "Transcriptional control of the human glucocorticoid receptor: identification and analysis of alternative promoter regions." Hum Genet **129**(5): 533-43.
- Cao-Lei, L., S. C. Leija, et al. (2011). "Transcriptional control of the human glucocorticoid receptor: identification and analysis of alternative promoter regions." Hum Genet **129**(5): 533-43.
- Carninci, P. (2007). "Constructing the landscape of the mammalian transcriptome." J Exp Biol **210**(Pt 9): 1497-506.
- Carninci, P., A. Sandelin, et al. (2006). "Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution." Nat Genet **38**(6): 626-35.
- Cartegni, L., J. Wang, et al. (2003). "ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers." Nucleic Acids Res **31**(13): 3568-71.
- Cedar, H. and Y. Bergman (2009). "Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms." Nat Rev Genet **10**(5): 295-304.
- Claessens, F. and D. T. Gewirth (2004). "DNA recognition by nuclear receptors." Essays Biochem **40**: 59-72.
- Clauson, P. G., K. Brismar, et al. (1998). "Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-1 in a representative population of type 2 diabetic patients in Sweden." Scand J Clin Lab Invest **58**(4): 353-60.
- Coffey, G. L., D. J. O'Sullivan, et al. (1979). "Hypoglycaemia secondary to pancreatic islet cell adenoma." Clin Exp Neurol **16**: 149-65.
- Coffey, R. J., Jr., G. D. Shipley, et al. (1986). "Production of transforming growth factors by human colon cancer lines." Cancer Res **46**(3): 1164-9.
- Colot, V. and J. L. Rossignol (1999). "Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device." Bioessays **21**(5): 402-11.

- Cooper, S. J., N. D. Trinklein, et al. (2006). "Comprehensive analysis of transcriptional promoter structure and function in 1% of the human genome." Genome Res **16**(1): 1-10.
- Culig, Z., A. Hobisch, et al. (1994). "Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor." Cancer Res **54**(20): 5474-8.
- Culig, Z., J. Hoffmann, et al. (1999). "Switch from antagonist to agonist of the androgen receptor bicalutamide is associated with prostate tumour progression in a new model system." Br J Cancer **81**(2): 242-51.
- Culig, Z., H. Klocker, et al. (1993). "DNA sequence of the androgen receptor in prostatic tumor cell lines and tissue specimens assessed by means of the polymerase chain reaction." Prostate **22**(1): 11-22.
- Culig, Z. and M. Pühr (2011). "Interleukin-6: a multifunctional targetable cytokine in human prostate cancer." Mol Cell Endocrinol **360**(1-2): 52-8.
- Chamberlain, N. L., E. D. Driver, et al. (1994). "The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function." Nucleic Acids Res **22**(15): 3181-6.
- Chamberlain, N. L., D. C. Whitacre, et al. (1996). "Delineation of two distinct type 1 activation functions in the androgen receptor amino-terminal domain." J Biol Chem **271**(43): 26772-8.
- Chan, J. M., M. J. Stampfer, et al. (2002). "Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding protein-3 as predictors of advanced-stage prostate cancer." J Natl Cancer Inst **94**(14): 1099-106.
- Chang, C., A. Saltzman, et al. (1995). "Androgen receptor: an overview." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **5**(2): 97-125.
- Chang, C. S., J. Kokontis, et al. (1988). "Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors." Science **240**(4850): 324-6.
- Chang, J. S., T. Wendt, et al. (2008). "Oxygen deprivation triggers upregulation of early growth response-1 by the receptor for advanced glycation end products." Circ Res **102**(8): 905-13.



- Chen, C., S. K. Lewis, et al. (2005). "Prostate carcinoma incidence in relation to prediagnostic circulating levels of insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein 3, and insulin." Cancer **103**(1): 76-84.
- Chen, C. D. and C. L. Sawyers (2002). "NF-kappa B activates prostate-specific antigen expression and is upregulated in androgen-independent prostate cancer." Mol Cell Biol **22**(8): 2862-70.
- Chen, C. D., D. S. Welsbie, et al. (2004). "Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy." Nat Med **10**(1): 33-9.
- Chen, C. M., H. L. Chen, et al. (2003). "Methylation target array for rapid analysis of CpG island hypermethylation in multiple tissue genomes." Am J Pathol **163**(1): 37-45.
- Chen, J. Q., M. Delannoy, et al. (2004). "Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells." Am J Physiol Endocrinol Metab **286**(6): E1011-22.
- Chen, J. Q., P. A. Russo, et al. (2007). "ERbeta shifts from mitochondria to nucleus during estrogen-induced neoplastic transformation of human breast epithelial cells and is involved in estrogen-induced synthesis of mitochondrial respiratory chain proteins." Biochim Biophys Acta **1773**(12): 1732-46.
- Chen, J. Q. and J. D. Yager (2004). "Estrogen's effects on mitochondrial gene expression: mechanisms and potential contributions to estrogen carcinogenesis." Ann N Y Acad Sci **1028**: 258-72.
- Chen, L. H., J. Fang, et al. (2007). "Enterolactone induces apoptosis in human prostate carcinoma LNCaP cells via a mitochondrial-mediated, caspase-dependent pathway." Mol Cancer Ther **6**(9): 2581-90.
- Chen, P. C., V. Patil, et al. (2008). "Synthesis and structure-activity relationship of histone deacetylase (HDAC) inhibitors with triazole-linked cap group." Bioorg Med Chem **16**(9): 4839-53.
- Chen, P. Y. and G. Meister (2005). "microRNA-guided posttranscriptional gene regulation." Biol Chem **386**(12): 1205-18.
- Chen, S., P. C. Supakar, et al. (1997). "Functional role of a conformationally flexible homopurine/homopyrimidine domain of the androgen receptor gene promoter interacting with Sp1 and a pyrimidine single strand DNA-binding protein." Mol Endocrinol **11**(1): 3-15.

- Cheung-Flynn, J., V. Prapapanich, et al. (2005). "Physiological role for the cochaperone FKBP52 in androgen receptor signaling." Mol Endocrinol **19**(6): 1654-66.
- Chodak, G. (2006). "Prostate cancer: epidemiology, screening, and biomarkers." Rev Urol **8 Suppl 2**: S3-8.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
- Chopra, D. P., R. E. Menard, et al. (2004). "TNF-alpha-mediated apoptosis in normal human prostate epithelial cells and tumor cell lines." Cancer Lett **203**(2): 145-54.
- Chuang, C. K., D. C. Chu, et al. (2007). "Hypermethylation of the CpG islands in the promoter region flanking GSTP1 gene is a potential plasma DNA biomarker for detecting prostate carcinoma." Cancer Detect Prev **31**(1): 59-63.
- Davuluri, R. V., Y. Suzuki, et al. (2000). "CART classification of human 5' UTR sequences." Genome Res **10**(11): 1807-16.
- De Marzo, A. M., E. A. Platz, et al. (2007). "Inflammation in prostate carcinogenesis." Nat Rev Cancer **7**(4): 256-69.
- de Pinieux, G., M. E. Legrier, et al. (2001). "Clinical and experimental progression of a new model of human prostate cancer and therapeutic approach." Am J Pathol **159**(2): 753-64.
- Decker, K. F., D. Zheng, et al. "Persistent androgen receptor-mediated transcription in castration-resistant prostate cancer under androgen-deprived conditions." Nucleic Acids Res **40**(21): 10765-79.
- Decker, K. F., D. Zheng, et al. (2012). "Persistent androgen receptor-mediated transcription in castration-resistant prostate cancer under androgen-deprived conditions." Nucleic Acids Res **40**(21): 10765-79.
- Dehm, S. M. and D. J. Tindall (2005). "Regulation of androgen receptor signaling in prostate cancer." Expert Rev Anticancer Ther **5**(1): 63-74.
- Demonacos, C. V., N. Karayanni, et al. (1996). "Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones." Steroids **61**(4): 226-32.
- Di Lorenzo, G., R. Autorino, et al. (2003). "External beam radiotherapy in bone metastatic prostate cancer: impact on patients' pain relief and quality of life." Oncol Rep **10**(2): 399-404.

- Di Lorenzo, G., G. Tortora, et al. (2002). "Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer." Clin Cancer Res **8**(11): 3438-44.
- Diez-Sanchez, C., E. Ruiz-Pesini, et al. (2003). "Mitochondrial DNA content of human spermatozoa." Biol Reprod **68**(1): 180-5.
- Diez-Sanchez, C., E. Ruiz-Pesini, et al. (2003). "Mitochondria from ejaculated human spermatozoa do not synthesize proteins." FEBS Lett **553**(1-2): 205-8.
- Ding, D., L. Xu, et al. (2004). "Effect of a short CAG (glutamine) repeat on human androgen receptor function." Prostate **58**(1): 23-32.
- Ding, D., L. Xu, et al. (2005). "Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action." Prostate **62**(2): 133-9.
- Ding, E. L., Y. Song, et al. (2006). "Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis." Jama **295**(11): 1288-99.
- Djakiew, D. (2000). "Dysregulated expression of growth factors and their receptors in the development of prostate cancer." Prostate **42**(2): 150-60.
- Djebali, S., C. A. Davis, et al. (2012). "Landscape of transcription in human cells." Nature **489**(7414): 101-8.
- Dragomir, E. and M. Simionescu (2006). "Monocyte chemoattractant protein-1--a major contributor to the inflammatory process associated with diabetes." Arch Physiol Biochem **112**(4-5): 239-44.
- Dubbink, H. J., R. Hersmus, et al. (2004). "Distinct recognition modes of FXXLF and LXXLL motifs by the androgen receptor." Mol Endocrinol **18**(9): 2132-50.
- Dunning, W. F. (1963). "Prostate Cancer in the Rat." Natl Cancer Inst Monogr **12**: 351-69.
- Eder, I. E., Z. Culig, et al. (2000). "Inhibition of Lncap prostate cancer cells by means of androgen receptor antisense oligonucleotides." Cancer Gene Ther **7**(7): 997-1007.
- Edwards, J. and J. M. Bartlett (2005). "The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 1: Modifications to the androgen receptor." BJU Int **95**(9): 1320-6.
- Esteller, M., M. F. Fraga, et al. (2001). "DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis." Hum Mol Genet **10**(26): 3001-7.
- Evans, R. M. (1988). "The steroid and thyroid hormone receptor superfamily." Science **240**(4854): 889-95.

- Everhart, J. and D. Wright (1995). "Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis." Jama **273**(20): 1605-9.
- Faber, P. W., H. C. van Rooij, et al. (1993). "Two different, overlapping pathways of transcription initiation are active on the TATA-less human androgen receptor promoter. The role of Sp1." J Biol Chem **268**(13): 9296-301.
- Faber, P. W., H. C. van Rooij, et al. (1991). "Characterization of the human androgen receptor transcription unit." J Biol Chem **266**(17): 10743-9.
- Fang, Y., A. E. Fliss, et al. (1996). "Hsp90 regulates androgen receptor hormone binding affinity in vivo." J Biol Chem **271**(45): 28697-702.
- Faustino, N. A. and T. A. Cooper (2003). "Pre-mRNA splicing and human disease." Genes Dev **17**(4): 419-37.
- Feinberg, A. P. (2007). "An epigenetic approach to cancer etiology." Cancer J **13**(1): 70-4.
- Feldman, B. J. and D. Feldman (2001). "The development of androgen-independent prostate cancer." Nat Rev Cancer **1**(1): 34-45.
- Fox-Walsh, K. L., Y. Dou, et al. (2005). "The architecture of pre-mRNAs affects mechanisms of splice-site pairing." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(45): 16176-81.
- Fradet, V., L. Lessard, et al. (2004). "Nuclear factor-kappaB nuclear localization is predictive of biochemical recurrence in patients with positive margin prostate cancer." Clin Cancer Res **10**(24): 8460-4.
- Freeman, M. R., B. Cinar, et al. (2005). "Membrane rafts as potential sites of nongenomic hormonal signaling in prostate cancer." Trends Endocrinol Metab **16**(6): 273-9.
- Friedlander, T. W., R. Roy, et al. (2011). "Common structural and epigenetic changes in the genome of castration-resistant prostate cancer." Cancer Res **72**(3): 616-25.
- Friedlander, T. W. and C. J. Ryan (2009). "Novel hormonal approaches in prostate cancer." Curr Oncol Rep **11**(3): 227-34.
- Friedlander, T. W. and C. J. Ryan (2012). "Targeting the androgen receptor." Urol Clin North Am **39**(4): 453-64.
- Fuks, F., W. A. Burgers, et al. (2001). "Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription." Embo J **20**(10): 2536-44.
- Gao, T. and M. J. McPhaul (1998). "Functional activities of the A and B forms of the human androgen receptor in response to androgen receptor agonists and antagonists." Mol Endocrinol **12**(5): 654-63.

- Gardiner-Garden, M. and M. Frommer (1987). "CpG islands in vertebrate genomes." J Mol Biol **196**(2): 261-82.
- Gasparian, A. V., Y. J. Yao, et al. (2002). "Selenium compounds inhibit I kappa B kinase (IKK) and nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) in prostate cancer cells." Mol Cancer Ther **1**(12): 1079-87.
- Gavrilova-Jordan, L. P. and T. M. Price (2007). "Actions of steroids in mitochondria." Semin Reprod Med **25**(3): 154-64.
- Gelmann, E. P. (2002). "Molecular biology of the androgen receptor." J Clin Oncol **20**(13): 3001-15.
- George, D. J., S. Halabi, et al. (2005). "The prognostic significance of plasma interleukin-6 levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer: results from cancer and leukemia group B 9480." Clin Cancer Res **11**(5): 1815-20.
- Gil Vernet, S. (1955). "[Infarct of the prostate]." Acta Urol Belg **23**(1): 7-16.
- Gilbert, W. (1978). "Why genes in pieces?" Nature **271**(5645): 501.
- Gioeli, D., B. E. Black, et al. (2006). "Stress kinase signaling regulates androgen receptor phosphorylation, transcription, and localization." Mol Endocrinol **20**(3): 503-15.
- Gioeli, D., S. B. Ficarro, et al. (2002). "Androgen receptor phosphorylation. Regulation and identification of the phosphorylation sites." J Biol Chem **277**(32): 29304-14.
- Gioeli, D. and B. M. Paschal (2012). "Post-translational modification of the androgen receptor." Mol Cell Endocrinol **352**(1-2): 70-8.
- Giovannucci, E., E. B. Rimm, et al. (1997). "Height, body weight, and risk of prostate cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **6**(8): 557-63.
- Glass, C. K. and M. G. Rosenfeld (2000). "The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors." Genes Dev **14**(2): 121-41.
- Glickman, M. H. and A. Ciechanover (2002). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction." Physiol Rev **82**(2): 373-428.
- Gnanasekar, M., S. Thirugnanam, et al. (2009). "Short hairpin RNA (shRNA) constructs targeting high mobility group box-1 (HMGB1) expression leads to inhibition of prostate cancer cell survival and apoptosis." Int J Oncol **34**(2): 425-31.
- Goldenberg, S. L., A. Koupparis, et al. (2011). "Differing levels of testosterone and the prostate: a physiological interplay." Nat Rev Urol **8**(7): 365-77.

- Gong, Z., M. L. Neuhouser, et al. (2006). "Obesity, diabetes, and risk of prostate cancer: results from the prostate cancer prevention trial." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **15**(10): 1977-83.
- Grad, J. M., J. L. Dai, et al. (1999). "Multiple androgen response elements and a Myc consensus site in the androgen receptor (AR) coding region are involved in androgen-mediated up-regulation of AR messenger RNA." Mol Endocrinol **13**(11): 1896-911.
- Graham, F. L., J. Smiley, et al. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.
- Grandien, K., M. Backdahl, et al. (1995). "Estrogen target tissue determines alternative promoter utilization of the human estrogen receptor gene in osteoblasts and tumor cell lines." Endocrinology **136**(5): 2223-9.
- Greenberg, N. M., F. DeMayo, et al. (1995). "Prostate cancer in a transgenic mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(8): 3439-43.
- Grossmann, M. and G. Wittert (2012). "Androgens, diabetes and prostate cancer." Endocr Relat Cancer **19**(5): F47-62.
- Grossmann, M. E., J. Lindzey, et al. (1994). "The mouse androgen receptor gene contains a second functional promoter which is regulated by dihydrotestosterone." Biochemistry **33**(48): 14594-600.
- Grote, V. A., S. Becker, et al. "Diabetes mellitus type 2 - an independent risk factor for cancer?" Exp Clin Endocrinol Diabetes **118**(1): 4-8.
- Grote, V. A., S. Becker, et al. (2010). "Diabetes mellitus type 2 - an independent risk factor for cancer?" Exp Clin Endocrinol Diabetes **118**(1): 4-8.
- Guo, Z., B. Dai, et al. (2006). "Regulation of androgen receptor activity by tyrosine phosphorylation." Cancer Cell **10**(4): 309-19.
- Guseva, N. V., A. F. Taghiyev, et al. (2004). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated activation of mitochondria-associated nuclear factor-kappaB in prostatic carcinoma cell lines." Mol Cancer Res **2**(10): 574-84.
- Gustafsson, R., J. R. Tata, et al. (1965). "The relationship between the structure and activity of rat skeletal muscle mitochondria after thyroidectomy and thyroid hormone treatment." J Cell Biol **26**(2): 555-78.

- Guyader, C., J. Ceraline, et al. (2012). "Risk of hormone escape in a human prostate cancer model depends on therapy modalities and can be reduced by tyrosine kinase inhibitors." PLoS One **7**(8): e42252.
- Haberland, M., M. H. Mokalled, et al. (2009). "Epigenetic control of skull morphogenesis by histone deacetylase 8." Genes Dev **23**(14): 1625-30.
- Haelens, A., T. Tanner, et al. (2007). "The hinge region regulates DNA binding, nuclear translocation, and transactivation of the androgen receptor." Cancer Res **67**(9): 4514-23.
- Haelens, A., G. Verrijdt, et al. (2003). "DNA recognition by the androgen receptor: evidence for an alternative DNA-dependent dimerization, and an active role of sequences flanking the response element on transactivation." Biochem J **369**(Pt 1): 141-51.
- Haffner, S. M., L. Mykkanen, et al. (2000). "Insulin-resistant prediabetic subjects have more atherogenic risk factors than insulin-sensitive prediabetic subjects: implications for preventing coronary heart disease during the prediabetic state." Circulation **101**(9): 975-80.
- Hales, D. B. (2002). "Another piece in the maddening puzzle of declining steroidogenesis in aging Leydig cells." J Androl **23**(3): 327-8; discussion 329.
- Hampsey, M. (1998). "Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery." Microbiol Mol Biol Rev **62**(2): 465-503.
- Hansen, K. D., W. Timp, et al. (2012). "Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types." Nat Genet **43**(8): 768-75.
- Hansson, G. K. (2005). "Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease." N Engl J Med **352**(16): 1685-95.
- Hara, T., H. Miyazaki, et al. (2008). "Androgen receptor and invasion in prostate cancer." Cancer Res **68**(4): 1128-35.
- Hara, T., K. Nakamura, et al. (2003). "Enhanced androgen receptor signaling correlates with the androgen-refractory growth in a newly established MDA PCa 2b-hr human prostate cancer cell subline." Cancer Res **63**(17): 5622-8.
- Hard, T., E. Kellenbach, et al. (1990). "Solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain." Science **249**(4965): 157-60.
- Hayes, S. A., M. Zarnegar, et al. (2001). "SMAD3 represses androgen receptor-mediated transcription." Cancer Res **61**(5): 2112-8.

- He, B., R. T. Gampe, Jr., et al. (2004). "Structural basis for androgen receptor interdomain and coactivator interactions suggests a transition in nuclear receptor activation function dominance." Mol Cell **16**(3): 425-38.
- He, B., J. A. Kempainen, et al. (1999). "Activation function 2 in the human androgen receptor ligand binding domain mediates interdomain communication with the NH(2)-terminal domain." J Biol Chem **274**(52): 37219-25.
- He, B., J. A. Kempainen, et al. (2000). "FXXLF and WXXLF sequences mediate the NH2-terminal interaction with the ligand binding domain of the androgen receptor." J Biol Chem **275**(30): 22986-94.
- Heinlein, C. A. and C. Chang (2001). "Role of chaperones in nuclear translocation and transactivation of steroid receptors." Endocrine **14**(2): 143-9.
- Heinlein, C. A. and C. Chang (2002). "Androgen receptor (AR) coregulators: an overview." Endocr Rev **23**(2): 175-200.
- Heinlein, C. A. and C. Chang (2002). "The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions." Mol Endocrinol **16**(10): 2181-7.
- Heinlein, C. A. and C. Chang (2004). "Androgen receptor in prostate cancer." Endocr Rev **25**(2): 276-308.
- Henderson, B. E., E. Bogdanoff, et al. (1974). "Evaluation of cancer risk factors in a retirement community." Cancer Res **34**(5): 1045-8.
- Herman, J. G. and S. B. Baylin (2000). "Promoter-region hypermethylation and gene silencing in human cancer." Curr Top Microbiol Immunol **249**: 35-54.
- Heyn, H. and M. Esteller "DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges." Nat Rev Genet **13**(10): 679-92.
- Heyn, H. and M. Esteller (2010). "DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges." Nat Rev Genet **13**(10): 679-92.
- Heyn, H. and M. Esteller (2012). "DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges." Nat Rev Genet **13**(10): 679-92.
- Hiranrat, P., P. Katavetin, et al. (2003). "Water and sodium disorders in children undergoing surgical treatment of brain tumors." J Med Assoc Thai **86 Suppl 2**: S152-9.
- Hirata, S., T. Shoda, et al. (2003). "Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans." Trends Endocrinol Metab **14**(3): 124-9.



- Hochheimer, A. and R. Tjian (2003). "Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression." Genes Dev **17**(11): 1309-20.
- Hofmann, M. A., S. Schiekofer, et al. (1998). "Insufficient glycemic control increases nuclear factor-kappa B binding activity in peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with type 1 diabetes." Diabetes Care **21**(8): 1310-6.
- Holzbeierlein, J. M., E. Castle, et al. (2004). "Complications of androgen deprivation therapy: prevention and treatment." Oncology (Williston Park) **18**(3): 303-9; discussion 310, 315, 319-21.
- Holzbeierlein, J. M., M. D. McLaughlin, et al. (2004). "Complications of androgen deprivation therapy for prostate cancer." Curr Opin Urol **14**(3): 177-83.
- Hopp, T. A. and S. A. Fuqua (1998). "Estrogen receptor variants." J Mammary Gland Biol Neoplasia **3**(1): 73-83.
- Hopp, T. A., H. L. Weiss, et al. (2004). "Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates." Clin Cancer Res **10**(8): 2751-60.
- Horszewicz, J. S., S. S. Leong, et al. (1980). "The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma." Prog Clin Biol Res **37**: 115-32.
- Horszewicz, J. S., S. S. Leong, et al. (1983). "LNCaP model of human prostatic carcinoma." Cancer Res **43**(4): 1809-18.
- Hsieh, H. L., B. W. Schafer, et al. (2003). "Expression analysis of S100 proteins and RAGE in human tumors using tissue microarrays." Biochem Biophys Res Commun **307**(2): 375-81.
- Hsing, A. W. (2001). "Hormones and prostate cancer: what's next?" Epidemiol Rev **23**(1): 42-58.
- Hsing, A. W. and A. P. Chokkalingam (2006). "Prostate cancer epidemiology." Front Biosci **11**: 1388-413.
- Hsing, A. W. and S. S. Devesa (2001). "Trends and patterns of prostate cancer: what do they suggest?" Epidemiol Rev **23**(1): 3-13.
- Hsing, A. W., L. C. Sakoda, et al. (2007). "Obesity, metabolic syndrome, and prostate cancer." Am J Clin Nutr **86**(3): s843-57.

- Hsing, A. Y., K. Kadomatsu, et al. (1996). "Regulation of apoptosis induced by transforming growth factor-beta1 in nontumorigenic rat prostatic epithelial cell lines." Cancer Res **56**(22): 5146-9.
- Hu, D., J. A. Henderson, et al. (1999). "Glycemic control in diabetic American Indians. Longitudinal data from the Strong Heart Study." Diabetes Care **22**(11): 1802-7.
- Hu, F. B., J. E. Manson, et al. (1999). "Prospective study of adult onset diabetes mellitus (type 2) and risk of colorectal cancer in women." J Natl Cancer Inst **91**(6): 542-7.
- Huang, J. S., J. Y. Guh, et al. (2001). "Role of receptor for advanced glycation end-product (RAGE) and the JAK/STAT-signaling pathway in AGE-induced collagen production in NRK-49F cells." J Cell Biochem **81**(1): 102-13.
- Huggins, C. and C. V. Hodges (2002). "Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941." J Urol **167**(2 Pt 2): 948-51; discussion 952.
- Humphries, A. D., I. C. Streimann, et al. (2005). "Dissection of the mitochondrial import and assembly pathway for human Tom40." J Biol Chem **280**(12): 11535-43.
- Hurtado, A., T. Pinos, et al. (2008). "Estrogen receptor beta displays cell cycle-dependent expression and regulates the G1 phase through a non-genomic mechanism in prostate carcinoma cells." Cell Oncol **30**(4): 349-65.
- Huttunen, H. J., C. Fages, et al. (1999). "Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways." J Biol Chem **274**(28): 19919-24.
- Ikeda, K., Y. Wada, et al. (2000). "Experimental diabetes-induced regression of the rat prostate is associated with an increased expression of transforming growth factor-beta." J Urol **164**(1): 180-5.
- Ikonen, T., J. J. Palvimo, et al. (1997). "Interaction between the amino- and carboxyl-terminal regions of the rat androgen receptor modulates transcriptional activity and is influenced by nuclear receptor coactivators." J Biol Chem **272**(47): 29821-8.
- Ioannou, I. M., N. Tsawdaroglou, et al. (1988). "Presence of glucocorticoid responsive elements in the mitochondrial genome." Anticancer Res **8**(6): 1405-9.
- Isaacs, J. T. (1984). "The aging ACI/Seg versus Copenhagen male rat as a model system for the study of prostatic carcinogenesis." Cancer Res **44**(12 Pt 1): 5785-96.

- Ishiguro, H., N. Nakaigawa, et al. (2005). "Receptor for advanced glycation end products (RAGE) and its ligand, amphoterin are overexpressed and associated with prostate cancer development." Prostate **64**(1): 92-100.
- Issa, J. P. (2000). "CpG-island methylation in aging and cancer." Curr Top Microbiol Immunol **249**: 101-18.
- Jackson, F. L. and J. C. Hutson (1984). "Altered responses to androgen in diabetic male rats." Diabetes **33**(9): 819-24.
- Jaenisch, R., K. Harbers, et al. (1982). "DNA methylation, retroviruses, and embryogenesis." J Cell Biochem **20**(4): 331-6.
- Jagla, M., M. Feve, et al. (2007). "A splicing variant of the androgen receptor detected in a metastatic prostate cancer exhibits exclusively cytoplasmic actions." Endocrinology **148**(9): 4334-43.
- Jarrard, D. F., H. Kinoshita, et al. (1998). "Methylation of the androgen receptor promoter CpG island is associated with loss of androgen receptor expression in prostate cancer cells." Cancer Res **58**(23): 5310-4.
- Jeltsch, J. M., B. Turcotte, et al. (1990). "Characterization of multiple mRNAs originating from the chicken progesterone receptor gene. Evidence for a specific transcript encoding form A." J Biol Chem **265**(7): 3967-74.
- Jenster, G., J. Trapman, et al. (1993). "Nuclear import of the human androgen receptor." Biochem J **293 ( Pt 3)**: 761-8.
- Jenster, G., H. A. van der Korput, et al. (1991). "Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization." Mol Endocrinol **5**(10): 1396-404.
- Jones, P. A. (2002). "DNA methylation and cancer." Oncogene **21**(35): 5358-60.
- Jones, P. A. (2012). "Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond." Nat Rev Genet **13**(7): 484-92.
- Jones, P. A. and S. B. Baylin (2002). "The fundamental role of epigenetic events in cancer." Nat Rev Genet **3**(6): 415-28.
- Joshua, A. M., A. Evans, et al. (2008). "Prostatic preneoplasia and beyond." Biochim Biophys Acta **1785**(2): 156-81.
- Joyce, D., C. Albanese, et al. (2001). "NF-kappaB and cell-cycle regulation: the cyclin connection." Cytokine Growth Factor Rev **12**(1): 73-90.

- Kaighn, M. E., J. F. Lechner, et al. (1980). "The Pasadena cell lines." Prog Clin Biol Res **37**: 85-109.
- Kalinyak, J. E., R. I. Dorin, et al. (1987). "Tissue-specific regulation of glucocorticoid receptor mRNA by dexamethasone." J Biol Chem **262**(22): 10441-4.
- Kan, Z., E. C. Rouchka, et al. (2001). "Gene structure prediction and alternative splicing analysis using genomically aligned ESTs." Genome Res **11**(5): 889-900.
- Kang, R., D. Tang, et al. (2010). "The receptor for advanced glycation end products (RAGE) sustains autophagy and limits apoptosis, promoting pancreatic tumor cell survival." Cell Death Differ **17**(4): 666-76.
- Kaput, J., J. Noble, et al. (2007). "Application of nutrigenomic concepts to Type 2 diabetes mellitus." Nutr Metab Cardiovasc Dis **17**(2): 89-103.
- Karin, M. (2009). "NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(5): a000141.
- Karin, M., Y. Cao, et al. (2002). "NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit." Nat Rev Cancer **2**(4): 301-10.
- Kasper, J. S. and E. Giovannucci (2006). "A meta-analysis of diabetes mellitus and the risk of prostate cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **15**(11): 2056-62.
- Kasper, J. S., Y. Liu, et al. (2009). "Diabetes mellitus and risk of prostate cancer in the health professionals follow-up study." Int J Cancer **124**(6): 1398-403.
- Kasper, J. S., Y. Liu, et al. (2008). "Hormonal profile of diabetic men and the potential link to prostate cancer." Cancer Causes Control **19**(7): 703-10.
- Katayama, S., Y. Tomaru, et al. (2005). "Antisense transcription in the mammalian transcriptome." Science **309**(5740): 1564-6.
- Keren, H., G. Lev-Maor, et al. "Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function." Nat Rev Genet **11**(5): 345-55.
- Keren, H., G. Lev-Maor, et al. (2010). "Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function." Nat Rev Genet **11**(5): 345-55.
- Kessler, II (1970). "A genetic relationship between diabetes and cancer." Lancet **1**(7640): 218-20.
- Kim, E., A. Goren, et al. (2008). "Alternative splicing and disease." RNA Biol **5**(1): 17-9.
- Kim, V. N. (2005). "Small RNAs: classification, biogenesis, and function." Mol Cells **19**(1): 1-15.

- Kimura, K., A. Wakamatsu, et al. (2006). "Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes." Genome Res **16**(1): 55-65.
- Knudsen, K. J., G. M. Nelander Holm, et al. (2009). "Driving gradual endogenous c-myc overexpression by flow-sorting: intracellular signaling and tumor cell phenotype correlate with oncogene expression." Arch Toxicol **83**(12): 1061-74.
- Ko, S., L. Shi, et al. (2008). "Interplay of nuclear factor-kappaB and B-myb in the negative regulation of androgen receptor expression by tumor necrosis factor alpha." Mol Endocrinol **22**(2): 273-86.
- Ko, Y. J., G. R. Devi, et al. (2004). "Androgen receptor down-regulation in prostate cancer with phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers." J Urol **172**(3): 1140-4.
- Koehler, C. M., S. Merchant, et al. (1999). "How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space." Trends Biochem Sci **24**(11): 428-32.
- Koufali, M. M., P. Moutsatsou, et al. (2003). "The dynamic localization of the glucocorticoid receptor in rat C6 glioma cell mitochondria." Mol Cell Endocrinol **209**(1-2): 51-60.
- Kozak, M. (1999). "Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes." Gene **234**(2): 187-208.
- Kraus, S., D. Gioeli, et al. (2006). "Receptor for activated C kinase 1 (RACK1) and Src regulate the tyrosine phosphorylation and function of the androgen receptor." Cancer Res **66**(22): 11047-54.
- Kroemer, G. (2006). "Mitochondria in cancer." Oncogene **25**(34): 4630-2.
- Krueckl, S. L., R. A. Sikes, et al. (2004). "Increased insulin-like growth factor I receptor expression and signaling are components of androgen-independent progression in a lineage-derived prostate cancer progression model." Cancer Res **64**(23): 8620-9.
- Kuiper, G. G., P. W. Faber, et al. (1989). "Structural organization of the human androgen receptor gene." J Mol Endocrinol **2**(3): R1-4.
- Kuniyasu, H., H. Ohmori, et al. (2003). "Production of interleukin 15 by human colon cancer cells is associated with induction of mucosal hyperplasia, angiogenesis, and metastasis." Clin Cancer Res **9**(13): 4802-10.
- Kuniyasu, H., N. Oue, et al. (2002). "Expression of receptors for advanced glycation end-products (RAGE) is closely associated with the invasive and metastatic activity of gastric cancer." J Pathol **196**(2): 163-70.

- Kyprianou, N. and J. T. Isaacs (1989). "Expression of transforming growth factor-beta in the rat ventral prostate during castration-induced programmed cell death." Mol Endocrinol **3**(10): 1515-22.
- La Spada, A. R., E. M. Wilson, et al. (1991). "Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy." Nature **352**(6330): 77-9.
- La Vecchia, C., E. Negri, et al. (1990). "Medical history and primary liver cancer." Cancer Res **50**(19): 6274-7.
- La Vecchia, C., E. Negri, et al. (1994). "A case-control study of diabetes mellitus and cancer risk." Br J Cancer **70**(5): 950-3.
- Lander, E. S., L. M. Linton, et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature **409**(6822): 860-921.
- Lander, H. M., J. M. Tauras, et al. (1997). "Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress." J Biol Chem **272**(28): 17810-4.
- Lantry, L. E., Z. Zhang, et al. (1999). "5-Aza-2'-deoxycytidine is chemopreventive in a 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced primary mouse lung tumor model." Carcinogenesis **20**(2): 343-6.
- Lavelle, C. and A. Prunell (2007). "Chromatin polymorphism and the nucleosome superfamily: a genealogy." Cell Cycle **6**(17): 2113-9.
- Leclerc, E., C. W. Heizmann, et al. (2009). "RAGE and S100 protein transcription levels are highly variable in human melanoma tumors and cells." Gen Physiol Biophys **28 Spec No Focus**: F65-75.
- Lee, C., D. M. Sutkowski, et al. (1995). "Regulation of proliferation and production of prostate-specific antigen in androgen-sensitive prostatic cancer cells, LNCaP, by dihydrotestosterone." Endocrinology **136**(2): 796-803.
- Lee, D. K. and C. Chang (2003). "Endocrine mechanisms of disease: Expression and degradation of androgen receptor: mechanism and clinical implication." J Clin Endocrinol Metab **88**(9): 4043-54.
- Lee, D. K., H. O. Duan, et al. (2001). "Androgen receptor interacts with the positive elongation factor P-TEFb and enhances the efficiency of transcriptional elongation." J Biol Chem **276**(13): 9978-84.

- Lee, J., C. H. Kim, et al. (2005). "Mitochondrial cyclic AMP response element-binding protein (CREB) mediates mitochondrial gene expression and neuronal survival." J Biol Chem **280**(49): 40398-401.
- Legrier, M. E., C. Guyader, et al. (2009). "Hormone escape is associated with genomic instability in a human prostate cancer model." Int J Cancer **124**(5): 1103-11.
- Lehrer, S., E. J. Diamond, et al. (2002). "Increased serum insulin associated with increased risk of prostate cancer recurrence." Prostate **50**(1): 1-3.
- Lemon, B. and R. Tjian (2000). "Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control." Genes Dev **14**(20): 2551-69.
- Leo, J. C. and V. C. Lin (2008). "The activities of progesterone receptor isoform A and B are differentially modulated by their ligands in a gene-selective manner." Int J Cancer **122**(1): 230-43.
- Li, E. (2002). "Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development." Nat Rev Genet **3**(9): 662-73.
- Li, J., X. Qu, et al. (1998). "Sp1-binding elements in the promoter of RAGE are essential for amphotericin-mediated gene expression in cultured neuroblastoma cells." J Biol Chem **273**(47): 30870-8.
- Li, L., C. H. Ren, et al. (2003). "Caveolin-1 maintains activated Akt in prostate cancer cells through scaffolding domain binding site interactions with and inhibition of serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A." Mol Cell Biol **23**(24): 9389-404.
- Li, L., G. Yang, et al. (2001). "Caveolin-1 mediates testosterone-stimulated survival/clonal growth and promotes metastatic activities in prostate cancer cells." Cancer Res **61**(11): 4386-92.
- Li, Y., M. Hussain, et al. (2005). "Gene expression profiling revealed novel mechanism of action of Taxotere and Furtulon in prostate cancer cells." BMC Cancer **5**: 7.
- Li, Y., M. A. Reddy, et al. (2008). "Role of the histone H3 lysine 4 methyltransferase, SET7/9, in the regulation of NF-kappaB-dependent inflammatory genes. Relevance to diabetes and inflammation." J Biol Chem **283**(39): 26771-81.
- Liao, Z., S. Wang, et al. (2005). "Increased phospho-AKT is associated with loss of the androgen receptor during the progression of N-methyl-N-nitrosourea-induced prostate carcinogenesis in rats." Prostate **64**(2): 186-99.

- Libby, P. and J. Plutzky (2002). "Diabetic macrovascular disease: the glucose paradox?" Circulation **106**(22): 2760-3.
- Like, A. A. and A. A. Rossini (1976). "Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus." Science **193**(4251): 415-7.
- Lilja, H., D. Ulmert, et al. (2008). "Prostate-specific antigen and prostate cancer: prediction, detection and monitoring." Nat Rev Cancer **8**(4): 268-78.
- Lindzey, J., M. V. Kumar, et al. (1994). "Molecular mechanisms of androgen action." Vitam Horm **49**: 383-432.
- Litvinov, I. V., A. M. De Marzo, et al. (2003). "Is the Achilles' heel for prostate cancer therapy a gain of function in androgen receptor signaling?" J Clin Endocrinol Metab **88**(7): 2972-82.
- Liu, A. Y., E. Corey, et al. (1996). "Prostatic cell lineage markers: emergence of BCL2+ cells of human prostate cancer xenograft LuCaP 23 following castration." Int J Cancer **65**(1): 85-9.
- Liu, L., Y. Li, et al. (2008). "Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases." Curr Issues Mol Biol **10**(1-2): 25-36.
- Liu, Z. J., G. Wang, et al. (2009). "Androgen receptor CpG island methylation status in human leukemia cancer cells." Cancer Invest **27**(2): 156-62.
- Lobaccaro, J. M., S. Lumbroso, et al. (1993). "Male breast cancer and the androgen receptor gene." Nat Genet **5**(2): 109-10.
- Lobaccaro, J. M., S. Lumbroso, et al. (1993). "Androgen receptor gene mutation in male breast cancer." Hum Mol Genet **2**(11): 1799-802.
- Loblaw, D. A. and P. Cheung (2006). "External beam irradiation for localized prostate cancer—the promise of hypofractionation." Can J Urol **13 Suppl 1**: 62-6.
- Lonergan, P. E. and D. J. Tindall "Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression." J Carcinog **10**: 20.
- Lonergan, P. E. and D. J. Tindall (2012). "Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression." J Carcinog **10**: 20.
- Losel, R. and M. Wehling (2003). "Nongenomic actions of steroid hormones." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(1): 46-56.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.



- Lubahn, D. B., D. R. Joseph, et al. (1988). "The human androgen receptor: complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate." Mol Endocrinol **2**(12): 1265-75.
- Lubahn, D. B., D. R. Joseph, et al. (1988). "Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome." Science **240**(4850): 327-30.
- Lubik, A. A., J. H. Gunter, et al. (2011). "Insulin increases de novo steroidogenesis in prostate cancer cells." Cancer Res **71**(17): 5754-64.
- Lucey, B. P., W. A. Nelson-Rees, et al. (2009). "Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination." Arch Pathol Lab Med **133**(9): 1463-7.
- Luco, R. F., Q. Pan, et al. (2010). "Regulation of alternative splicing by histone modifications." Science **327**(5968): 996-1000.
- Luisi, B. F., W. X. Xu, et al. (1991). "Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA." Nature **352**(6335): 497-505.
- Ma, Y., C. Y. Chan, et al. (2007). "RNA interference and antiviral therapy." World J Gastroenterol **13**(39): 5169-79.
- Malinowska, K., H. Neuwirt, et al. (2009). "Interleukin-6 stimulation of growth of prostate cancer in vitro and in vivo through activation of the androgen receptor." Endocr Relat Cancer **16**(1): 155-69.
- Mansour, A. M. and S. Nass (1970). "In vivo cortisol action on RNA synthesis in rat liver nuclei and mitochondria." Nature **228**(5272): 665-7.
- Mansour, A. M. and S. Nass (1974). "RNA synthesis in rat liver after cortisol treatment: a possible mitochondrial-nuclear relationship." Acta Endocrinol (Copenh) **77**(2): 298-309.
- Martikainen, P. M., S. I. Makela, et al. (1987). "Interaction of male and female sex hormones in cultured rat prostate." Prostate **11**(4): 291-303.
- Matias, P. M., P. Donner, et al. (2000). "Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. Implications for pathogenic gene mutations." J Biol Chem **275**(34): 26164-71.
- McGarvey, K. M., E. Greene, et al. (2007). "DNA methylation and complete transcriptional silencing of cancer genes persist after depletion of EZH2." Cancer Res **67**(11): 5097-102.

- McKenna, N. J., R. B. Lanz, et al. (1999). "Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology." Endocr Rev **20**(3): 321-44.
- McNeal, J. E. (1968). "Regional morphology and pathology of the prostate." Am J Clin Pathol **49**(3): 347-57.
- Meyer, H. E., T. E. Robsahm, et al. "Vitamin D, season, and risk of prostate cancer: a nested case-control study within Norwegian health studies." Am J Clin Nutr **97**(1): 147-54.
- Meyer, T. E., L. W. Chu, et al. "The association between inflammation-related genes and serum androgen levels in men: the prostate, lung, colorectal, and ovarian study." Prostate **72**(1): 65-71.
- Meyer, T. E., L. W. Chu, et al. (2012). "The association between inflammation-related genes and serum androgen levels in men: the prostate, lung, colorectal, and ovarian study." Prostate **72**(1): 65-71.
- Miao, F. and R. Natarajan (2005). "Mapping global histone methylation patterns in the coding regions of human genes." Mol Cell Biol **25**(11): 4650-61.
- Mickey, D. D., K. R. Stone, et al. (1980). "Characterization of a human prostate adenocarcinoma cell line (DU 145) as a monolayer culture and as a solid tumor in athymic mice." Prog Clin Biol Res **37**: 67-84.
- Milagro, F. I., J. Campion, et al. (2009). "High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats." J Physiol Biochem **65**(1): 1-9.
- Mizokami, A. and C. Chang (1994). "Induction of translation by the 5'-untranslated region of human androgen receptor mRNA." J Biol Chem **269**(41): 25655-9.
- Mizokami, A., A. Gotoh, et al. (2000). "Tumor necrosis factor-alpha represses androgen sensitivity in the LNCaP prostate cancer cell line." J Urol **164**(3 Pt 1): 800-5.
- Modrek, B. and C. Lee (2002). "A genomic view of alternative splicing." Nat Genet **30**(1): 13-9.
- Modrek, B., A. Resch, et al. (2001). "Genome-wide detection of alternative splicing in expressed sequences of human genes." Nucleic Acids Res **29**(13): 2850-9.
- Moilanen, A., N. Rouleau, et al. (1997). "The presence of a transcription activation function in the hormone-binding domain of androgen receptor is revealed by studies in yeast cells." FEBS Lett **412**(2): 355-8.

- Monath, J. R., D. L. McCullough, et al. (1995). "Physiologic variations of serum testosterone within the normal range do not affect serum prostate-specific antigen." *Urology* **46**(1): 58-61.
- Montgomery, B. T., C. Y. Young, et al. (1992). "Hormonal regulation of prostate-specific antigen (PSA) glycoprotein in the human prostatic adenocarcinoma cell line, LNCaP." *Prostate* **21**(1): 63-73.
- Morgentaler, A. (2011). "Turning conventional wisdom upside-down: low serum testosterone and high-risk prostate cancer." *Cancer* **117**(17): 3885-8.
- Mostaghel, E. A., S. T. Page, et al. (2007). "Intraprostatic androgens and androgen-regulated gene expression persist after testosterone suppression: therapeutic implications for castration-resistant prostate cancer." *Cancer Res* **67**(10): 5033-41.
- Mulac-Jericevic, B., J. P. Lydon, et al. (2003). "Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(17): 9744-9.
- Muller, D. C., G. Severi, et al. (2009). "Dietary patterns and prostate cancer risk." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**(11): 3126-9.
- Muller, S., C. Hoege, et al. (2001). "SUMO, ubiquitin's mysterious cousin." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(3): 202-10.
- Musunuru, K. (2003). "Cell-specific RNA-binding proteins in human disease." *Trends Cardiovasc Med* **13**(5): 188-95.
- Nagy, L. and J. W. Schwabe (2004). "Mechanism of the nuclear receptor molecular switch." *Trends Biochem Sci* **29**(6): 317-24.
- Naito, M., Y. Asai, et al. (2012). "Association of obesity and diabetes with serum prostate-specific antigen levels in Japanese males." *Nagoya J Med Sci* **74**(3-4): 285-92.
- Nakayama, N., J. Lee, et al. (2000). "Vascular endothelial growth factor synergistically enhances bone morphogenetic protein-4-dependent lymphohematopoietic cell generation from embryonic stem cells in vitro." *Blood* **95**(7): 2275-83.
- Nakayama, T., M. Watanabe, et al. (2000). "Epigenetic regulation of androgen receptor gene expression in human prostate cancers." *Lab Invest* **80**(12): 1789-96.
- Nakayama, Y., T. Sako, et al. (2000). "Relationship between plasma levels of vascular endothelial growth factor and serum levels of interleukin-12 in patients with colorectal cancer." *Anticancer Res* **20**(6A): 4097-102.

- Neumann, F. and M. Topert (1986). "Pharmacology of antiandrogens." J Steroid Biochem **25**(5B): 885-95.
- Nevalainen, M. T., E. M. Valve, et al. (1991). "Estrogen and prolactin regulation of rat dorsal and lateral prostate in organ culture." Endocrinology **129**(2): 612-22.
- Nilsson, S. and J. A. Gustafsson (2002). "Biological role of estrogen and estrogen receptors." Crit Rev Biochem Mol Biol **37**(1): 1-28.
- Noble, R. L. (1977). "The development of prostatic adenocarcinoma in Nb rats following prolonged sex hormone administration." Cancer Res **37**(6): 1929-33.
- O'Mara, B. A., T. Byers, et al. (1985). "Diabetes mellitus and cancer risk: a multisite case-control study." J Chronic Dis **38**(5): 435-41.
- Ogita, K., Y. Fujinami, et al. (2003). "Transcription factor activator protein-1 expressed by kainate treatment can bind to the non-coding region of mitochondrial genome in murine hippocampus." J Neurosci Res **73**(6): 794-802.
- Ogita, K., H. Okuda, et al. (2002). "Localization of activator protein-1 complex with DNA binding activity in mitochondria of murine brain after in vivo treatment with kainate." J Neurosci **22**(7): 2561-70.
- Ohtsuki, S., M. Levine, et al. (1998). "Different core promoters possess distinct regulatory activities in the Drosophila embryo." Genes Dev **12**(4): 547-56.
- Okamoto, H. (1985). "The role of poly(ADP-ribose) synthetase in the development of insulin-dependent diabetes and islet B-cell regeneration." Biomed Biochim Acta **44**(1): 15-20.
- Olson, N. C., P. W. Callas, et al. "Circulating levels of TNF-alpha are associated with impaired glucose tolerance, increased insulin resistance, and ethnicity: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study." J Clin Endocrinol Metab **97**(3): 1032-40.
- Olson, N. C., P. W. Callas, et al. (2012). "Circulating levels of TNF-alpha are associated with impaired glucose tolerance, increased insulin resistance, and ethnicity: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study." J Clin Endocrinol Metab **97**(3): 1032-40.
- Ozanne, D. M., M. E. Brady, et al. (2000). "Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the f-actin cross-linking protein filamin." Mol Endocrinol **14**(10): 1618-26.
- Pan, G., S. Tian, et al. (2007). "Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells." Cell Stem Cell **1**(3): 299-312.

- Paz, G., Z. T. Homonnai, et al. (1978). "Improvement in the fertility of streptozotocin-diabetic male rats following treatment with insulin and human chorionic gonadotropin." Isr J Med Sci **14**(10): 1073-8.
- Peehl, D. M. and T. A. Stamey (1986). "Oncogenes: a review with relevance to cancers of the urogenital tract." J Urol **135**(5): 897-904.
- Pemberton, L. F. and B. M. Paschal (2005). "Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export." Traffic **6**(3): 187-98.
- Pennisi, E. "Genome sequencing. Search for pore-fection." Science **336**(6081): 534-7.
- Pennisi, E. (2000). "Genomics. Fruit fly genome yields data and validation." Science **287**(5457): 1374.
- Perkins, N. D. (2000). "The Rel/NF-kappa B family: friend and foe." Trends Biochem Sci **25**(9): 434-40.
- Pierce, B. L. "Why are diabetics at reduced risk for prostate cancer? A review of the epidemiologic evidence." Urol Oncol **30**(5): 735-43.
- Pierce, B. L. (2012). "Why are diabetics at reduced risk for prostate cancer? A review of the epidemiologic evidence." Urol Oncol **30**(5): 735-43.
- Pinos, T., A. Barbosa-Desongles, et al. (2009). "Identification, characterization and expression of novel Sex Hormone Binding Globulin alternative first exons in the human prostate." BMC Mol Biol **10**: 59.
- Pissios, P., I. Tzamelis, et al. (2000). "Dynamic stabilization of nuclear receptor ligand binding domains by hormone or corepressor binding." Mol Cell **6**(2): 245-53.
- Pitteloud, N., M. Hardin, et al. (2005). "Increasing insulin resistance is associated with a decrease in Leydig cell testosterone secretion in men." J Clin Endocrinol Metab **90**(5): 2636-41.
- Piva, R. and L. Del Senno (1993). "Analysis of a DNA sequence upstream of the human estrogen receptor gene." Ann N Y Acad Sci **684**: 235-8.
- Polonsky, K. S. (1999). "Evolution of beta-cell dysfunction in impaired glucose tolerance and diabetes." Exp Clin Endocrinol Diabetes **107 Suppl 4**: S124-7.
- Polychronakos, C., U. Jantilly, et al. (1991). "Mitogenic effects of insulin and insulin-like growth factors on PA-III rat prostate adenocarcinoma cells: characterization of the receptors involved." Prostate **19**(4): 313-21.

- Pollard, M. (1973). "Spontaneous prostate adenocarcinomas in aged germfree Wistar rats." J Natl Cancer Inst **51**(4): 1235-41.
- Poukka, H., U. Karvonen, et al. (2000). "Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1)." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14145-50.
- Poukka, H., U. Karvonen, et al. (2000). "The RING finger protein SNURF modulates nuclear trafficking of the androgen receptor." J Cell Sci **113 ( Pt 17)**: 2991-3001.
- Pratt, W. B. and D. O. Toft (1997). "Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones." Endocr Rev **18**(3): 306-60.
- Pratt, W. B. and D. O. Toft (2003). "Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery." Exp Biol Med (Maywood) **228**(2): 111-33.
- Presul, E., S. Schmidt, et al. (2007). "Identification, tissue expression, and glucocorticoid responsiveness of alternative first exons of the human glucocorticoid receptor." J Mol Endocrinol **38**(1-2): 79-90.
- Psarra, A. M. and C. E. Sekeris (2008). "Nuclear receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria: regulatory molecules in a new environment." Biochim Biophys Acta **1783**(1): 1-11.
- Psarra, A. M. and C. E. Sekeris (2008). "Steroid and thyroid hormone receptors in mitochondria." IUBMB Life **60**(4): 210-23.
- Pugh, B. F. and R. Tjian (1991). "Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex." Genes Dev **5**(11): 1935-45.
- Quigley, C. A., A. De Bellis, et al. (1995). "Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives." Endocr Rev **16**(3): 271-321.
- Ragozzino, M., L. J. Melton, 3rd, et al. (1982). "Subsequent cancer risk in the incidence cohort of Rochester, Minnesota, residents with diabetes mellitus." J Chronic Dis **35**(1): 13-9.
- Ram, O. and G. Ast (2007). "SR proteins: a foot on the exon before the transition from intron to exon definition." Trends Genet **23**(1): 5-7.
- Raser, J. M. and E. K. O'Shea (2004). "Control of stochasticity in eukaryotic gene expression." Science **304**(5678): 1811-4.
- Rebouissou, S., V. Vasiliu, et al. (2005). "Germline hepatocyte nuclear factor 1alpha and 1beta mutations in renal cell carcinomas." Hum Mol Genet **14**(5): 603-14.

- Reese, J. H., J. E. McNeal, et al. (1986). "Differential distribution of pepsinogen II between the zones of the human prostate and the seminal vesicle." J Urol **136**(5): 1148-52.
- Reese, J. H., J. E. McNeal, et al. (1988). "Tissue type plasminogen activator as a marker for functional zones, within the human prostate gland." Prostate **12**(1): 47-53.
- Reymond, M. A., R. Steinert, et al. (2002). "Ethical, legal and economic issues raised by the use of human tissue in postgenomic research." Dig Dis **20**(3-4): 257-65.
- Richter, E., S. Srivastava, et al. (2007). "Androgen receptor and prostate cancer." Prostate Cancer Prostatic Dis **10**(2): 114-8.
- Rideout, W. M., 3rd, P. Eversole-Cire, et al. (1994). "Progressive increases in the methylation status and heterochromatinization of the myoD CpG island during oncogenic transformation." Mol Cell Biol **14**(9): 6143-52.
- Rigau, M., I. Ortega, et al. (2011). "A three-gene panel on urine increases PSA specificity in the detection of prostate cancer." Prostate **71**(16): 1736-45.
- Roberts, J. T. and D. M. Essenhig (1986). "Adenocarcinoma of prostate in 40-year-old body-builder." Lancet **2**(8509): 742.
- Robertson, K. D., S. Ait-Si-Ali, et al. (2000). "DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters." Nat Genet **25**(3): 338-42.
- Ross, J. S., B. V. Kallakury, et al. (2004). "Expression of nuclear factor-kappa B and I kappa B alpha proteins in prostatic adenocarcinomas: correlation of nuclear factor-kappa B immunoreactivity with disease recurrence." Clin Cancer Res **10**(7): 2466-72.
- Roth, M. J., C. C. Abnet, et al. (2006). "p16, MGMT, RARbeta2, CLDN3, CRBP and MT1G gene methylation in esophageal squamous cell carcinoma and its precursor lesions." Oncol Rep **15**(6): 1591-7.
- Rothermund, C. A., V. K. Gopalakrishnan, et al. (2004). "Androgen signaling and post-transcriptional downregulation of Bcl-2 in androgen-unresponsive prostate cancer." Prostate Cancer Prostatic Dis **7**(2): 158-64.
- Roy-Burman, P., H. Wu, et al. (2004). "Genetically defined mouse models that mimic natural aspects of human prostate cancer development." Endocr Relat Cancer **11**(2): 225-54.
- Royai, R., P. H. Lange, et al. (1996). "Preclinical models of prostate cancer." Semin Oncol **23**(6 Suppl 14): 35-40.

- Rozenberg, J. M., A. Shlyakhtenko, et al. (2008). "All and only CpG containing sequences are enriched in promoters abundantly bound by RNA polymerase II in multiple tissues." BMC Genomics **9**: 67.
- Saitoh, T., M. Igura, et al. (2007). "Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states." Embo J **26**(22): 4777-87.
- Sambuy, Y. (2007). "Sideways Glance: Genome wide association studies for type 2 diabetes mellitus." Genes Nutr **2**(3): 245-8.
- Sasaki, M., Y. Tanaka, et al. (2002). "Methylation and inactivation of estrogen, progesterone, and androgen receptors in prostate cancer." J Natl Cancer Inst **94**(5): 384-90.
- Schaufele, F., X. Carbonell, et al. (2005). "The structural basis of androgen receptor activation: intramolecular and intermolecular amino-carboxy interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(28): 9802-7.
- Scheller, K., P. Seibel, et al. (2003). "Glucocorticoid and thyroid hormone receptors in mitochondria of animal cells." Int Rev Cytol **222**: 1-61.
- Scheller, K. and C. E. Sekeris (2003). "The effects of steroid hormones on the transcription of genes encoding enzymes of oxidative phosphorylation." Exp Physiol **88**(1): 129-40.
- Schellhammer, P. F. (2002). "An evaluation of bicalutamide in the treatment of prostate cancer." Expert Opin Pharmacother **3**(9): 1313-28.
- Scherer, W. F., J. T. Syverton, et al. (1953). "Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix." J Exp Med **97**(5): 695-710.
- Schnedl, W. J., S. Ferber, et al. (1994). "STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells." Diabetes **43**(11): 1326-33.
- Schug, J., W. P. Schuller, et al. (2005). "Promoter features related to tissue specificity as measured by Shannon entropy." Genome Biol **6**(4): R33.
- Schwartz, S., E. Meshorer, et al. (2009). "Chromatin organization marks exon-intron structure." Nat Struct Mol Biol **16**(9): 990-5.
- Seaton, A., P. Scullin, et al. (2008). "Interleukin-8 signaling promotes androgen-independent proliferation of prostate cancer cells via induction of androgen receptor expression and activation." Carcinogenesis **29**(6): 1148-56.



- See, W. A. and C. J. Tyrrell (2006). "The addition of bicalutamide 150 mg to radiotherapy significantly improves overall survival in men with locally advanced prostate cancer." J Cancer Res Clin Oncol **132 Suppl 1**: S7-16.
- Sekeris, C. E. (1990). "The mitochondrial genome: a possible primary site of action of steroid hormones." In Vivo **4**(5): 317-20.
- Sen, R. and D. Baltimore (1986). "Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism." Cell **47**(6): 921-8.
- Sen, R. and D. Baltimore (1986). "Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences." Cell **46**(5): 705-16.
- Shanmugam, N., M. A. Reddy, et al. (2003). "High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells." Diabetes **52**(5): 1256-64.
- Sharifi, N., E. M. Hurt, et al. (2008). "Androgen receptor expression in prostate cancer stem cells: is there a conundrum?" Cancer Chemother Pharmacol **62**(5): 921-3.
- Sharifi, N. and B. S. Kramer (2007). "Screening for prostate cancer: current status and future prospects." Am J Med **120**(9): 743-5.
- Sharp, P. A. (1994). "Split genes and RNA splicing." Cell **77**(6): 805-15.
- Shukla, S., G. T. MacLennan, et al. (2004). "Nuclear factor-kappaB/p65 (Rel A) is constitutively activated in human prostate adenocarcinoma and correlates with disease progression." Neoplasia **6**(4): 390-400.
- Siegel, R., E. Ward, et al. (2011). "Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths." CA Cancer J Clin **61**(4): 212-36.
- Sikand, K., J. E. Slaibi, et al. (2011). "miR 488\* inhibits androgen receptor expression in prostate carcinoma cells." Int J Cancer **129**(4): 810-9.
- Simental, J. A., M. Sar, et al. (1991). "Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor." J Biol Chem **266**(1): 510-8.
- Simo, R., A. Barbosa-Desongles, et al. "Potential role of tumor necrosis factor-alpha in downregulating sex hormone-binding globulin." Diabetes **61**(2): 372-82.
- Simo, R., A. Barbosa-Desongles, et al. (2012). "Potential role of tumor necrosis factor-alpha in downregulating sex hormone-binding globulin." Diabetes **61**(2): 372-82.

- Simo, R., A. Barbosa-Desongles, et al. "Molecular Mechanism of TNF $\alpha$ -Induced Down-Regulation of SHBG Expression." Mol Endocrinol **26**(3): 438-46.
- Simo, R., A. Barbosa-Desongles, et al. (2012). "Molecular Mechanism of TNF $\alpha$ -Induced Down-Regulation of SHBG Expression." Mol Endocrinol **26**(3): 438-46.
- Singer, G. A., J. Wu, et al. (2008). "Genome-wide analysis of alternative promoters of human genes using a custom promoter tiling array." BMC Genomics **9**: 349.
- Singh, R., A. Barden, et al. (2001). "Advanced glycation end-products: a review." Diabetologia **44**(2): 129-46.
- Sivolob, A. and A. Prunell (2004). "Nucleosome conformational flexibility and implications for chromatin dynamics." Philos Transact A Math Phys Eng Sci **362**(1820): 1519-47.
- Smale, S. T. (1997). "Transcription initiation from TATA-less promoters within eukaryotic protein-coding genes." Biochim Biophys Acta **1351**(1-2): 73-88.
- Smale, S. T. and D. Baltimore (1989). "The "initiator" as a transcription control element." Cell **57**(1): 103-13.
- Smale, S. T. and J. T. Kadonaga (2003). "The RNA polymerase II core promoter." Annu Rev Biochem **72**: 449-79.
- Smith, D. C. (1997). "Secondary hormonal therapy." Semin Urol Oncol **15**(1): 3-12.
- Solakidi, S., A. M. Psarra, et al. (2005). "Differential subcellular distribution of estrogen receptor isoforms: localization of ER $\alpha$  in the nucleoli and ER $\beta$  in the mitochondria of human osteosarcoma SaOS-2 and hepatocarcinoma HepG2 cell lines." Biochim Biophys Acta **1745**(3): 382-92.
- Solakidi, S. and C. E. Sekeris (2003). "Oligonucleotide sequences similar to transcription factor consensi of nuclear genes are present in the human mitochondrial genome." Anticancer Res **23**(2B): 1389-93.
- Solit, D. B., H. I. Scher, et al. (2003). "Hsp90 as a therapeutic target in prostate cancer." Semin Oncol **30**(5): 709-16.
- Sonenberg, N. and A. G. Hinnebusch (2009). "Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets." Cell **136**(4): 731-45.
- Song, C. S., M. H. Jung, et al. (1999). "Negative regulation of the androgen receptor gene promoter by NFI and an adjacently located multiprotein-binding site." Mol Endocrinol **13**(9): 1487-96.

- Sonnenschein, C., N. Olea, et al. (1989). "Negative controls of cell proliferation: human prostate cancer cells and androgens." Cancer Res **49**(13): 3474-81.
- Sonpavde, G., A. Aparicio, et al. (2007). "Phase II study of azacitidine to restore responsiveness of prostate cancer to hormonal therapy." Clin Genitourin Cancer **5**(7): 457-9.
- Stanworth, R. D., D. Kapoor, et al. (2008). "Androgen receptor CAG repeat polymorphism is associated with serum testosterone levels, obesity and serum leptin in men with type 2 diabetes." Eur J Endocrinol **159**(6): 739-46.
- Stattin, P., A. Bylund, et al. (2000). "Plasma insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-binding proteins, and prostate cancer risk: a prospective study." J Natl Cancer Inst **92**(23): 1910-7.
- Stearns, M. E., J. L. Ware, et al. (1998). "Workgroup 2: human xenograft models of prostate cancer." Prostate **36**(1): 56-8.
- Sterner, D. A., T. Carlo, et al. (1996). "Architectural limits on split genes." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15081-5.
- Strickler, H. D., J. Wylie-Rosett, et al. (2001). "The relation of type 2 diabetes and cancer." Diabetes Technol Ther **3**(2): 263-74.
- Struhl, K., W. Chen, et al. (1985). "Constitutive and coordinately regulated transcription of yeast genes: promoter elements, positive and negative regulatory sites, and DNA binding proteins." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **50**: 489-503.
- Supakar, P. C., M. H. Jung, et al. (1995). "Nuclear factor kappa B functions as a negative regulator for the rat androgen receptor gene and NF-kappa B activity increases during the age-dependent desensitization of the liver." J Biol Chem **270**(2): 837-42.
- Suzuki, H., A. R. Forrest, et al. (2009). "The transcriptional network that controls growth arrest and differentiation in a human myeloid leukemia cell line." Nat Genet **41**(5): 553-62.
- Sweeney, C., L. Li, et al. (2004). "Nuclear factor-kappaB is constitutively activated in prostate cancer in vitro and is overexpressed in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma of the prostate." Clin Cancer Res **10**(16): 5501-7.
- Syms, A. J., J. S. Norris, et al. (1985). "Mechanism of androgen-receptor augmentation. Analysis of receptor synthesis and degradation by the density-shift technique." J Biol Chem **260**(1): 455-61.

- Szyf, M. (2009). "Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs." Annu Rev Pharmacol Toxicol **49**: 243-63.
- Szyf, M. (2009). "Implications of a life-long dynamic epigenome." Epigenomics **1**(1): 9-12.
- Taguchi, A., D. C. Blood, et al. (2000). "Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases." Nature **405**(6784): 354-60.
- Takeda, H., T. Nakamoto, et al. (1991). "Autoregulation of androgen receptor expression in rodent prostate: immunohistochemical and in situ hybridization analysis." Biochem Biophys Res Commun **177**(1): 488-96.
- Tan, J. A., D. R. Joseph, et al. (1988). "The rat androgen receptor: primary structure, autoregulation of its messenger ribonucleic acid, and immunocytochemical localization of the receptor protein." Mol Endocrinol **2**(12): 1276-85.
- Tanaka, N., H. Yonekura, et al. (2000). "The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor-alpha through nuclear factor-kappa B, and by 17beta-estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells." J Biol Chem **275**(33): 25781-90.
- Tanner, T., F. Claessens, et al. (2004). "The hinge region of the androgen receptor plays a role in proteasome-mediated transcriptional activation." Ann N Y Acad Sci **1030**: 587-92.
- Taplin, M. E., B. Rajeshkumar, et al. (2003). "Androgen receptor mutations in androgen-independent prostate cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9663." J Clin Oncol **21**(14): 2673-8.
- Tateishi, K., Y. Okada, et al. (2009). "Role of Jhdm2a in regulating metabolic gene expression and obesity resistance." Nature **458**(7239): 757-61.
- Thomas, G., K. B. Jacobs, et al. (2008). "Multiple loci identified in a genome-wide association study of prostate cancer." Nat Genet **40**(3): 310-5.
- Thomassin, H., M. Flavin, et al. (2001). "Glucocorticoid-induced DNA demethylation and gene memory during development." Embo J **20**(8): 1974-83.
- Thompson, M. M., C. Garland, et al. (1989). "Heart disease risk factors, diabetes, and prostatic cancer in an adult community." Am J Epidemiol **129**(3): 511-7.
- Tian, J., S. O. Lee, et al. (2012). "Targeting the unique methylation pattern of androgen receptor (AR) promoter in prostate stem/progenitor cells with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA) leads to suppressed prostate tumorigenesis." J Biol Chem **287**(47): 39954-66.

- Tilgner, H., C. Nikolaou, et al. (2009). "Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition." Nat Struct Mol Biol **16**(9): 996-1001.
- Tilley, W. D., M. Marcelli, et al. (1989). "Characterization and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(1): 327-31.
- Tokatlidis, K. (2000). "Directing proteins to mitochondria by fusion to mitochondrial targeting signals." Methods Enzymol **327**: 305-17.
- Tomlins, S. A., B. Laxman, et al. (2007). "Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer." Nature **448**(7153): 595-9.
- Tomlins, S. A., R. Mehra, et al. (2007). "Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression." Nat Genet **39**(1): 41-51.
- Tomlins, S. A., D. R. Rhodes, et al. (2005). "Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer." Science **310**(5748): 644-8.
- Toure, F., G. Fritz, et al. (2012). "Formin mDia1 mediates vascular remodeling via integration of oxidative and signal transduction pathways." Circ Res **110**(10): 1279-93.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Traish, A. M. and A. Morgentaler (2009). "Epidermal growth factor receptor expression escapes androgen regulation in prostate cancer: a potential molecular switch for tumour growth." Br J Cancer **101**(12): 1949-56.
- Tran, C., S. Ouk, et al. (2009). "Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer." Science **324**(5928): 787-90.
- Trapman, J., P. Klaassen, et al. (1988). "Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor." Biochem Biophys Res Commun **153**(1): 241-8.
- Tsao, C. K., M. D. Galsky, et al. "Targeting the androgen receptor signalling axis in castration-resistant prostate cancer (CRPC)." BJU Int **110**(11): 1580-8.
- Tsao, C. K., M. D. Galsky, et al. (2012). "Targeting the androgen receptor signalling axis in castration-resistant prostate cancer (CRPC)." BJU Int **110**(11): 1580-8.
- Tsao, C. K., A. C. Small, et al. (2012). "Overcoming castration resistance in prostate cancer." Curr Opin Urol **22**(3): 167-74.
- Tsiryotis, C., D. A. Spandidos, et al. (1997). "The mitochondrion as a primary site of action of glucocorticoids: mitochondrial nucleotide sequences, showing similarity to hormone

- response elements, confer dexamethasone inducibility to chimaeric genes transfected in LTK- cells." Biochem Biophys Res Commun **235**(2): 349-54.
- Tsuritani, K., T. Irie, et al. (2007). "Distinct class of putative "non-conserved" promoters in humans: comparative studies of alternative promoters of human and mouse genes." Genome Res **17**(7): 1005-14.
- Tuch, B. E., J. R. Turtle, et al. (1989). "Streptozotocin is not toxic to the human fetal B cell." Diabetologia **32**(9): 678-84.
- Turner, J. D. and C. P. Muller (2005). "Structure of the glucocorticoid receptor (NR3C1) gene 5' untranslated region: identification, and tissue distribution of multiple new human exon 1." J Mol Endocrinol **35**(2): 283-92.
- Turner, J. D., A. B. Schote, et al. (2006). "Tissue specific glucocorticoid receptor expression, a role for alternative first exon usage?" Biochem Pharmacol **72**(11): 1529-37.
- Tyrrell, C. J., P. Iversen, et al. (2006). "Tolerability, efficacy and pharmacokinetics of bicalutamide 300 mg, 450 mg or 600 mg as monotherapy for patients with locally advanced or metastatic prostate cancer, compared with castration." BJU Int **98**(3): 563-72.
- Van Antwerp, D. J., S. J. Martin, et al. (1996). "Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB." Science **274**(5288): 787-9.
- Veldscholte, J., C. A. Berrevoets, et al. (1992). "The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens." J Steroid Biochem Mol Biol **41**(3-8): 665-9.
- Velicer, C. M., S. Dublin, et al. (2007). "Diabetes and the risk of prostate cancer: the role of diabetes treatment and complications." Prostate Cancer Prostatic Dis **10**(1): 46-51.
- Venter, J. C., M. D. Adams, et al. (2001). "The sequence of the human genome." Science **291**(5507): 1304-51.
- Waddington, C. H. (1969). "Gene regulation in higher cells." Science **166**(3905): 639-40.
- Wainstein, M. A., F. He, et al. (1994). "CWR22: androgen-dependent xenograft model derived from a primary human prostatic carcinoma." Cancer Res **54**(23): 6049-52.
- Wakat, D. K. and R. C. Haynes, Jr. (1977). "Glucocorticoid-stimulated utilization of substrates in hepatic mitochondria." Arch Biochem Biophys **184**(2): 561-71.

- Walton, T. J., G. Li, et al. (2008). "DNA demethylation and histone deacetylation inhibition co-operate to re-express estrogen receptor beta and induce apoptosis in prostate cancer cell-lines." Prostate **68**(2): 210-22.
- Wallner, L. P., H. Morgenstern, et al. "The effects of type 2 diabetes and hypertension on changes in serum prostate specific antigen levels: results from the Olmsted County study." Urology **77**(1): 137-41.
- Wallner, L. P., H. Morgenstern, et al. (2011). "The effects of type 2 diabetes and hypertension on changes in serum prostate specific antigen levels: results from the Olmsted County study." Urology **77**(1): 137-41.
- Wang, C. Y., M. W. Mayo, et al. (1996). "TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB." Science **274**(5288): 784-7.
- Wang, D., R. B. Montgomery, et al. (2009). "Reduced tumor necrosis factor receptor-associated death domain expression is associated with prostate cancer progression." Cancer Res **69**(24): 9448-56.
- Wang, S., J. Gao, et al. (2003). "Prostate-specific deletion of the murine Pten tumor suppressor gene leads to metastatic prostate cancer." Cancer Cell **4**(3): 209-21.
- Wang, Z. and H. Gleichmann (1998). "GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice." Diabetes **47**(1): 50-6.
- Waters, K. M., B. E. Henderson, et al. (2009). "Association of diabetes with prostate cancer risk in the multiethnic cohort." Am J Epidemiol **169**(8): 937-45.
- Waterston, R. H., E. S. Lander, et al. (2002). "On the sequencing of the human genome." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(6): 3712-6.
- Weber, K., P. Bruck, et al. (2002). "Glucocorticoid hormone stimulates mitochondrial biogenesis specifically in skeletal muscle." Endocrinology **143**(1): 177-84.
- Wei, S. H., C. Balch, et al. (2006). "Prognostic DNA methylation biomarkers in ovarian cancer." Clin Cancer Res **12**(9): 2788-94.
- Wei, S. H., C. M. Chen, et al. (2002). "Methylation microarray analysis of late-stage ovarian carcinomas distinguishes progression-free survival in patients and identifies candidate epigenetic markers." Clin Cancer Res **8**(7): 2246-52.

- Weijerman, P. C., Y. Zhang, et al. (1998). "Expression of prostatic factors measured by reverse transcription polymerase chain reaction in human papillomavirus type 18 deoxyribonucleic acid immortalized prostate cell lines." Urology **51**(4): 657-62.
- Weiss, B., H. Faus, et al. (2007). "Phylogenetic conservation of the androgen receptor AR45 variant form in placental mammals." Gene **399**(2): 105-11.
- Welsbie, D. S., J. Xu, et al. (2009). "Histone deacetylases are required for androgen receptor function in hormone-sensitive and castrate-resistant prostate cancer." Cancer Res **69**(3): 958-66.
- Whitaker, H. C., S. Hanrahan, et al. (2004). "Androgen receptor is targeted to distinct subcellular compartments in response to different therapeutic antiandrogens." Clin Cancer Res **10**(21): 7392-401.
- Wilson, C. M. and M. J. McPhaul (1994). "A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(4): 1234-8.
- Williams, S. A., C. A. Jelinek, et al. "Enzymatically active prostate-specific antigen promotes growth of human prostate cancers." Prostate **71**(15): 1595-607.
- Wooster, R., J. Mangion, et al. (1992). "A germline mutation in the androgen receptor gene in two brothers with breast cancer and Reifenstein syndrome." Nat Genet **2**(2): 132-4.
- Yan, S. F., R. Ramasamy, et al. (2010). "The RAGE axis: a fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature." Circ Res **106**(5): 842-53.
- Yang, M., Y. Li, et al. (2005). "MicroRNAs: Small regulators with a big impact." Cytokine Growth Factor Rev **16**(4-5): 387-93.
- Yano, M., N. Hoogenraad, et al. (2000). "Identification and functional analysis of human Tom22 for protein import into mitochondria." Mol Cell Biol **20**(19): 7205-13.
- Yeap, B. B., J. A. Wilce, et al. (2004). "The androgen receptor mRNA." Bioessays **26**(6): 672-82.
- Yeo, G. W., E. Van Nostrand, et al. (2005). "Identification and analysis of alternative splicing events conserved in human and mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 2850-5.
- Young, J. C., N. J. Hoogenraad, et al. (2003). "Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70." Cell **112**(1): 41-50.



- Zegarra-Moro, O. L., L. J. Schmidt, et al. (2002). "Disruption of androgen receptor function inhibits proliferation of androgen-refractory prostate cancer cells." Cancer Res **62**(4): 1008-13.
- Zhang, B., X. Pan, et al. (2007). "microRNAs as oncogenes and tumor suppressors." Dev Biol **302**(1): 1-12.
- Zhang, L., S. Altuwaijri, et al. (2009). "NF-kappaB regulates androgen receptor expression and prostate cancer growth." Am J Pathol **175**(2): 489-99.
- Zhang, L., M. Charron, et al. (2004). "Nuclear factor-kappaB activates transcription of the androgen receptor gene in Sertoli cells isolated from testes of adult rats." Endocrinology **145**(2): 781-9.
- Zhang, X., J. C. Lanter, et al. (2009). "Recent advances in the development of selective androgen receptor modulators." Expert Opin Ther Pat **19**(9): 1239-58.
- Zhang, Y. and D. Reinberg (2001). "Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails." Genes Dev **15**(18): 2343-60.
- Zhao, J., M. Li, et al. (2009). "Examination of type 2 diabetes loci implicates CDKAL1 as a birth weight gene." Diabetes **58**(10): 2414-8.
- Zhao, X. D., X. Han, et al. (2007). "Whole-genome mapping of histone H3 Lys4 and 27 trimethylations reveals distinct genomic compartments in human embryonic stem cells." Cell Stem Cell **1**(3): 286-98.
- Zhou, B., L. Chen, et al. (2008). "MH1 domain of SMAD4 binds N-terminal residues of the homeodomain of Hoxc9." Biochim Biophys Acta **1784**(5): 747-52.
- Zhou, X. C., S. C. Dowdy, et al. (2007). "Epigenetic considerations for endometrial cancer prevention, diagnosis and treatment." Gynecol Oncol **107**(1): 143-53.
- Zhou, Z. X., J. A. Kempainen, et al. (1995). "Identification of three proline-directed phosphorylation sites in the human androgen receptor." Mol Endocrinol **9**(5): 605-15.
- Zhou, Z. X., C. I. Wong, et al. (1994). "The androgen receptor: an overview." Recent Prog Horm Res **49**: 249-74.
- Zhu, B. and N. Kyprianou (2005). "Transforming growth factor beta and prostate cancer." Cancer Treat Res **126**: 157-73.

LLIBRE:

Clifford J, Flatt R. *Animals syndromes of non-insulin-dependent Diabetes Mellitus*. Textbook of Diabetes Mellitus. 2nd ed. Blackwell Science; CIUDAD 1998:23.1-23.25. 1998