

DETECCIÓN DE NCAM Y PSA COMO POSIBLE BIOMARCADOR DE CÁNCER COLORRECTAL

Jonatan Reboredo- Durán & Fátima Núñez Baz

e- mail: jonreboredo@uvigo.es, fanunez@alumnos.uvigo.es

Resumen

Trabajo Fin de Grado

Tutores:

- Emilio Gil Martín

- Almudena Fernández Briera

Departamento de Bioquímica,

Genética e Inmunología

Facultad de Biología

Universidad de Vigo.

El conocimiento de la bioquímica celular y, en concreto, los avances de la bioquímica estructural y funcional de las proteínas que permiten la unión y adhesión entre las células (*Cell Adhesion Molecules* o CAM), como es el caso de la Molécula de Adhesión de las Células Neurales (NCAM), ha permitido dilucidar el importante papel desempeñado por esta proteína (y otras CAM) en el cáncer colorrectal (CCR). En este orden de cosas, la especificidad y versatilidad de técnicas clásicas de la biología celular (inmunohistoquímica), unidas a la potencia de otras más recientes surgidas del espectacular desarrollo de la biología molecular (*western blot*, proteómica), constituyen un conjunto de herramientas de enorme utilidad para conocer en detalle la estructura y función de la NCAM, así como para explorar la posible utilidad de esta proteína como biomarcador tumoral del CCR.

Palabras clave: NCAM, PSA, inmunoblot, cáncer de colon.

INTRODUCCIÓN

Las células que componen los tejidos mantienen su estructura gracias a la interacción de las Moléculas de Adhesión Celular (CAM). Gracias a la acción de estas proteínas se establece una extensa red de contactos intercelulares, que apuntalan y sustentan los tejidos (Wilson, 1907).

Un miembro destacado de este grupo es la Molécula de Adhesión de las Células Neurales (conocida como NCAM o CD56), aislada y caracterizada por Brackenbury y Thiery en dos estudios independientes (Thiery *et al.*, 1977; Rutishayser *et al.*, 1978). La NCAM interviene en una gran variedad de eventos celulares, como ponen de manifiesto múltiples trabajos publicados en los últimos años (Berezin, 2010). Por sus características estructurales la NCAM pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), la familia proteica de mayor amplitud en el genoma humano.

Estructura y expresión del gen codificante para la NCAM

La proteína NCAM es codificada por un único gen, que se encuentra en la banda q23 del cromosoma 11 en el genoma humano (Nguyen *et al.*, 1986). Este gen sufre un proceso de splicing del que surgen varias isoformas con características diferentes (Barton *et al.*, 1990), que se identifican por sus respectivas masas moleculares aparentes; 120 kDa, 140 kDa y 180 kDa. La organización de los exones del gen para la NCAM está muy relacionada con la estructura por dominios de la molécula (Owens *et al.*, 1987). Así, el gen, con una longitud de 314 kb, consiste en 25 exones, de los cuales 19 son los más importantes para generar la estructura de las 3 isoformas principales anteriormente citadas; 15 de ellos (del 0 al 14) codifican la expresión del dominio extracelular, que es idéntico en todas las isoformas. La expresión del exón 15, por su parte, da lugar a la formación de un péptido de 725 aminoácidos exclusivo de la isoforma de 120 kDa del que depende su anclaje a la membrana, ya que esta isoforma tiene la peculiaridad de presentarse unida a la membrana a través de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Para la formación de las isoformas de mayor peso molecular es necesaria la transcripción alternativa de los exones 16-19, que codifican para la parte intracelular de la NCAM. De este modo, el exón 16 codifica para la porción de

transmembrana de la proteína y el exón 17 para la cola citoplasmática, ambos expresados en las isoformas de 180 kDa y de 140 kDa. La expresión del exón 18 (genera 950 aa) es exclusivo de la isoforma de 180 kDa y produce una cola citoplasmática que interacciona con el citoesqueleto. El exón 19, sin embargo, codifica para el extremo N-terminal de ambas isoformas de la proteína.

Modificaciones post-traduccionales de la NCAM

Esta proteína habitualmente sufre procesos de glicosilación, esto es, la unión mediante enlaces covalentes de glúcidos (Figura 1A). Las enzimas encargadas de catalizar este tipo de uniones son las glicosiltransferasas (GT) (Rademacher *et al.*,1988). Las glicoproteínas son, por lo tanto, heteroproteínas con una fracción proteica y una fracción glucídica, entre las cuales se distinguen dos tipos dependiendo de la clase de unión entre péptido y glúcido: N-glicoproteínas si la unión se produce a través de un enlace N-glicosídico con el grupo amida de la cadena lateral de un residuo de asparagina y O-glicoproteínas si la unión se establece con el grupo hidroxilo de la cadena lateral de un residuo de serina o de treonina.

Durante su biosíntesis la molécula de NCAM sufre también otros tipos de modificaciones postraduccionales como sulfatación, fosforilación y palmitoilación (Figura 1A). Sin embargo, de todas las modificaciones que experimenta esta proteína la más peculiar es la polisialilación, esto es, la adicción de un homopolímero líneal de residuos de ácido N-acetilneuramínico unidos por enlaces alpha-(2,8), llamado ácido polisialílico (PSA).

La molécula de PSA es un polisacárido no ramificado con características hidrofílicas y una alta densidad de carga negativa, así como de grupos neutros, todo lo cual le confiere una alta capacidad de retención de agua. Como consecuencia de ello aumenta significativamente el radio hidrodinámico de la proteína y al mismo tiempo se reduce su potencial de establecimiento de uniones intercelulares a causa de impedimento estérico y repulsión electrostática (Figura 1C).

Las enzimas poliasililtransferasas encargadas de este proceso de polisialilación de la NCAM son las glicosiltransferasas ST8Sia II (STX) y ST8Sia IV (PST) (Nakayama *et al.*,1998). Estudiando sus requerimientos y modo de acción se ha llegado a la conclusión de que el grado de polisialilación del PSA es regulado según el ambiente celular y las condiciones del tejido.

La NCAM contiene seis secuencias consenso (N1-N6) susceptibles de sufrir N-glicosilación. La polisialilación está confinada a los dominios Ig 3, Ig 4 e Ig 5 de la proteína (Figura 1A), mientras que Ig 1, Ig 2, FN III1 y FN III2 no son glicosilados, a excepción de un enlace O-glicosídico en la región MSD1 (situado entre las repeticiones FN) (Von der Ohe *et al.*, 2002).

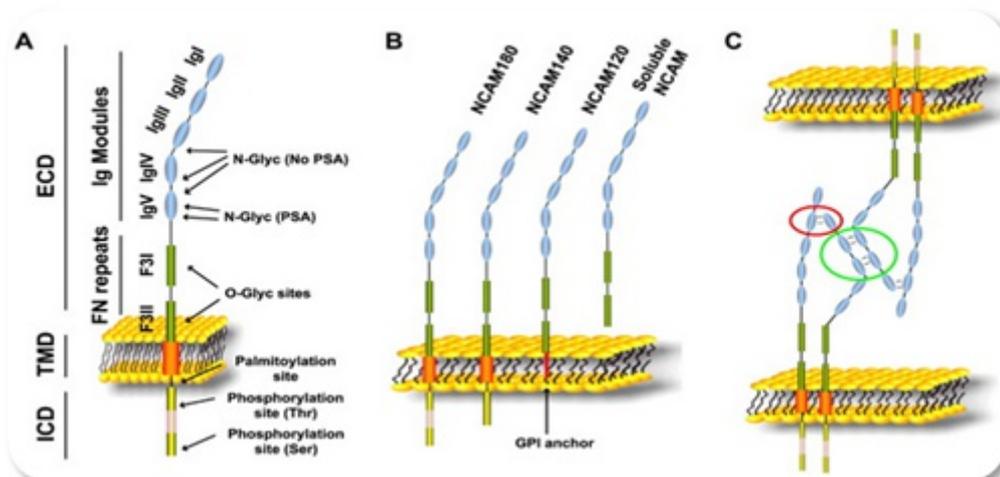


Figura 1. Representación estructural de la NCAM (Gascon *et al.*, 2007). A) Estructura por dominios de la NCAM (izquierda) y modificaciones post-traduccionales (derecha) que se encuentran en el núcleo de la proteína NCAM. B) Estructura molecular de las principales isoformas de la NCAM incluyendo los diferentes tipos de unión a la membrana celular de cada una. C) Unión homofílica de dos células (trans) por mediación de la NCAM. ECD: extracellular domain; TMD: transmembrane domain; ICD: intracellular domain.

Relación de la NCAM y de su estado de polisialilación con el cáncer colorrectal

El CCR es la segunda neoplasia con mayor tasa de mortalidad entre la población europea, tanto en hombres como en mujeres (por detrás de pulmón y mama, respectivamente). La tasa de morbimortalidad se ve mermada si su detección ocurre en estadios tempranos de la enfermedad (Ferlay *et al.*, 2013).

Los cambios en las propiedades adhesivas célula-célula y de adhesión a la matriz extracelular están implicados en la progresión tumoral. Numerosos estudios en este sentido corroboran que las alteraciones en los niveles y función de las moléculas de adhesión o de las proteínas que median entre las células y la matriz extracelular, están asociadas con la invasión cancerígena y la metástasis (Cavallaro, 2004). Así, por ejemplo, a lo largo de los últimos años se han acumulado evidencias que confirman fehacientemente la relación entre el alto contenido de PSA en NCAM y el potencial maligno de ciertos tipos de células tumorales (Rutishauser, 2008; Seifert *et al.*, 2012). No obstante lo anterior, hasta la fecha no existen muchos estudios sobre la relación de NCAM y PSA con el CCR, así como tampoco sobre la identificación de las diferentes isoformas de NCAM que se expresan en el tejido colorrectal.

El patrón de expresión de la NCAM en CCR parecía adaptarse al de un supresor tumoral, ya que el desarrollo del carcinoma de colon parece estar acompañado de una disminución de la expresión de la NCAM de 180 kDa en las células tumorales, lo que, además, se ha podido correlacionar con un aumento de la agresividad clínica de la enfermedad debido a la pérdida de adhesividad entre las células tumorales.

En concreto, se ha encontrado que la isoforma de 180 kDa está presente en el tejido sano y que se encuentra ausente en carcinomas de colon clínicamente agresivos (Roesler *et al.*, 1997; Huerta *et al.*, 2001). De acuerdo con lo anterior, los pacientes que expresan la isoforma de NCAM de 180 kDa presentarían una buena progresión como consecuencia de la preservación del potencial adhesivo de las células mediado por esta proteína. La caída de expresión, *down-regulation*, de la NCAM en el tejido tumoral de CCR se debe a un mecanismo de *splicing* alternativo que trunca la secuencia de ARNm de la NCAM entre los exones 12 y 13 (Huerta *et al.*, 2001). Debido a este proceso la molécula sufre un corte selectivo entre las dos repeticiones Fn III y pierde el ectodominio. Este fenómeno conduce a la liberación de un fragmento soluble de la NCAM, cuyo potencial como marcador de algunas formas agresivas del CCR espera aún ser estudiado en profundidad. Pese a los pocos estudios realizados sobre el papel de la NCAM en el CCR, no faltan resultados contradictorios entre los trabajos de diferentes autores. Es el caso, por ejemplo, de un estudio con pacientes afectados por CCR en el que no se pudo demostrar la relación de la regulación a la baja de la isoforma de 180 kDa de la NCAM con un aumento de la malignidad (Tascilar *et al.*, 2007).

Estudios posteriores sobre la expresión conjunta de PSA y NCAM en biopsias de pacientes afectados de CCR han encontrado que en una mayoría de casos aparece una correlación positiva entre la expresión de la proteína y su grado de polisialilación tanto en el tejido sano como tumoral, así como que en este último una regulación al alza o *up-regulation* de ambas (Fernández-Briera *et al.*, 2010). Estos primeros resultados acercan el comportamiento de la PSA-NCAM en el CCR al reportado en otras neoplasias (pulmón, tiroides, etc), en las que la sobreexpresión de la proteína y el aumento de su grado de polisialilación contribuyen favorablemente a la dispersión de las células tumorales (y, por tanto, a la malignidad del proceso canceroso) al debilitar los contactos intercelulares.

Objetivos

La disponibilidad clínica de biomarcadores que permitan un diagnóstico precoz del CCR reviste una gran importancia debido a que la alta mortalidad de esta enfermedad es consecuencia de su detección habitual en estadios de desarrollo tumoral avanzados.

Es un hecho sabido que en la biología del cáncer determinadas proteínas desempeñan funciones de una gran relevancia en el control de la bioquímica celular y, por lo tanto, en el origen y progresión de la neoplasia. En este ámbito, la oncología molecular ha puesto de manifiesto a lo largo de los últimos años la especial importancia de las CAM, ya que controlan el establecimiento de uniones entre las células y además participan en procesos de señalización química entre las células y su microentorno.

Dentro de la familia de las CAM, el área de glicobiología del grupo de investigación BB1 de la Universidad de Vigo mantiene abierta una línea de trabajo sobre la PSA-NCAM. Como fruto del trabajo realizado hasta la fecha se han obtenido interesantes resultados sobre la expresión inmunohistoquímica de la forma polisialilada de la proteína en el CCR (Fernández-Briera *et al.*, 2010), que apuntan la existencia de una *up-regulation* tanto de la expresión de la proteína como de su grado de polisialilación. De confirmarse estos datos por los estudios en marcha, el CCR añadiría a su repertorio de estrategias de propagación (hasta ahora circunscritas al de un supresor tumoral, que experimenta una pérdida de expresión en el tejido tumoral) el debilitamiento de la adhesividad intercelular provocado por la hipersialilación de la NCAM, tal como está establecido que ocurre en algunos tipos de cáncer pulmonar o de tiroides.

En consideración de cuanto se ha expuesto hasta aquí, con el fin de confirmar la relevancia de la NCAM en el CCR se ha emprendido un estudio con los siguientes objetivos:

- Análisis de la expresión de la PSA-NCAM en especímenes de tejido sano y tumoral de pacientes operados de CCR mediante ensayos de inmunoblot acoplados a detección por quimioluminiscencia.
- Puesta a punto de un protocolo para la separación de las isoformas de PSA-NCAM mediante un proceso bidimensional 2D-PAGE, para una posterior detección mediante espectrometría de masas (MS).

MATERIAL Y MÉTODOS

Los especímenes empleados fueron resecciones quirúrgicas de tejido colorrectal tumoral y sano (situado al menos a 10 cm del foco tumoral y sin signos microscópicos de malignidad), procedentes de pacientes con diagnóstico de cáncer colorrectal. Los especímenes fueron suministrados por los Servicios de Cirugía y Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario de Ourense (CHUO). Una vez obtenidos en quirófano, los especímenes fueron inmediatamente congelados a -80°C hasta su empleo. Se cumplieron todas las estipulaciones éticas a que obliga la legislación vigente, contándose con el consentimiento informado de los pacientes y un procedimiento protocolizado de manejo de los historiales clínicos que ha preservado en todo momento el anonimato de éstos.

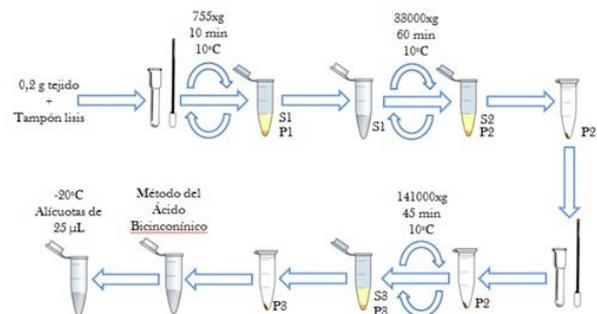


Figura 2. Procesamiento de los especímenes. S (sobrenadante); P (precipitado).

El procedimiento de obtención de la muestra (Figura 2) partió de fracciones de entre 0,2-0,3 g del tejido biopsiado (sano y tumor). Este material de partida se troceó y homogeneizó a 4°C en presencia de un tampón de lisis compuesto por Tris-HCl 0,01 M (pH 7,4), sacarosa 0,25 M y antiproteasas.

El homogeneizado inicial se centrifugó a 755xg (2500 rpm) durante 10 min a 10°C en una centrífuga de alta velocidad Centrikon T-124. El sobrenadante obtenido fue resuspendido en tampón Tris-HCl 0,01 M a pH 7,4 para, a continuación, someterse a una ultracentrifugación a 33000xg durante 1 h a 10°C . El sobrenadante así obtenido (fracción citosólica) se descartó, mientras que el precipitado (fracción de membranas totales) se resuspendió cuidadosamente en el tampón anterior y se volvió a homogeneizar. A continuación se realizó una segunda ultracentrifugación a 14100xg, durante 45 min a 10°C . Se descartó nuevamente el sobrenadante y se obtuvo la muestra para los ensayos mediante la resuspensión del precipitado en 200 μL de Tris-HCl 0,01 M (pH 7,4). La cuantificación de proteínas totales se realizó mediante el método del ácido bicinonínico (Smith *et al.*, 1985). Las preparaciones obtenidas se almacenaron en alícuotas de 25 μL a -20°C hasta su empleo.

Electroforesis monodimensional en condiciones desnaturizantes: SDS-PAGE

La primera fase del proceso de separación bidimensional se fundamentó en las diferencias en pI de las proteínas de la muestra mediante una aplicación de isoelectroenfoque (IEF). El proceso se realizó con tiras de *ReadyStrip* (Bio-Rad) de un rango de pH 4-7, 3-10 o pH 4,7-5,9 según muestras. Las tiras de IEF se cargaron con 80 µg de preparación de membranas totales y c.s.p. hasta completar 150 mL con un buffer de lisis compuesto por urea 7 M, tiourea 2 M y CHAPS al 4% (v/v) (*Electrophoresis Purity Reagent*; Bio-Rad). Además, se añadieron los anfólitos transportadores de microrango de pH (*Bio-Lyte 4/7* o *Bio-Lytes 4,7/5,9 Ampholyte*; Bio-Rad) y 1,15 mg de DTT (Bio-Rad), 1,5 µL de *Bio-Lytes* y 1 µg de azul de bromofenol al 2% (p/v).

El IEF se realizó en un *Protean IEF Cell* (Bio-Rad). La tira de IEF se rehidrató pasivamente durante 5 min. El programa de rehidratación activa duró 19 h en varias etapas: fase inicial de 250 V durante 15 min, rampa de voltaje lineal desde 250 V hasta 4.000 V, enfoque final de 20.000 V/h. El proceso terminó tras una etapa de mantenimiento durante 60 min a 500 V para evitar la deriva de las proteínas.

Con antelación a la segunda fase de separación se realizó un proceso de equilibrado en una solución de Tris-HCl 50 mM, urea 6 mM, glicerol al 30% (p/v) y SDS al 2% (p/v), pH 8,8. Esta misma solución base se utilizó para realizar dos lavados de 10 min, añadiendo DTT al 0,01% (p/v). Seguidamente, en la misma solución anteriormente descrita se añadió iodoacetamida al 0,025% (p/v) con 1 µL de azul de bromofenol al 0,2% (v/v), con la que se realizaron dos lavados de 10 min.

Para la realización de la segunda dimensión se colocó la tira de IEF sobre un gel de poli(acrilamida) al 7,5%, reservando un pocillo en la esquina para los marcadores preteñidos de amplio rango de masa molecular (*Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder*, Fermentas). Para el sellado de la unión entre la tira y el gel se usó agarosa con un bajo punto de fusión al 0,5% (p/v) en tampón de electroforesis.

Una vez soldados ambos geles se procedió a la separación electroforética, la segunda fase del proceso 2D-PAGE que opera una separación en base a las diferencias en masas moleculares de las proteínas. Para ello se preparó un sistema de electroforesis monodimensional en condiciones desnaturizantes sobre una matriz de poli(acrilamida) [30% acrilamida/Bis Solution 37,5:1 (2,6% C), Bio-Rad] discontinua formada por acrilamida al 4% en Tris-HCl 1,5M (pH 8,8) en el gel concentrador y al 7,5% en Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) en el gel separador. La electroforesis se llevó a cabo con el equipo Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad) a 150 V durante el tránsito de las muestras por el gel concentrador y a 180 V durante el resto del tiempo de desarrollo (el tiempo necesario para que el frente del trazador azul de bromofenol alcance el borde inferior del gel). El tampón de carga estuvo compuesto por Tris-HCl 50 mM (p/v), pH 6,8, SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,1% (p/v), glicerol 10% (p/v) y β-mercaptoetanol 5% (v/v) y el tampón de electrodo por Tris-HCl 25 mM, glicina 0,19 y SDS 0,1% (w/v), Ph 6,8. Previamente a la electroforesis las muestras fueron desnaturizadas hirviéndolas durante 5 min.

Para conocer la masa molecular aparente de las proteínas de la muestra usamos un conjunto de estándares preteñidos (*Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder*; Fermentas) formado por un conjunto de proteínas con masas moleculares conocidas.

Una vez concluida la SDS-PAGE se tiñó el gel con nitrato de plata o bien se electrotransfirió a una membrana de PVDF para la realización del inmunoblot.

Inmunoblot

El gel destinado al inmunoblot se mantuvo durante 30 min en tampón de transferencia [Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 10% (v/v)] en agitación. A la vez, se activó la membrana de PVDF con metanol al 100% (v/v) durante 20 s y se equilibró en tampón de transferencia. Para la transferencia se utilizó el equipo Mini TransBlot (Bio-Rad) y un amperaje constante de 350 mA durante 65 min. Tras la transferencia, se procedió a un lavado con H₂O_d.

Immunoblot con revelado quimioluminiscente de NCAM y PSA

El inmunoblot se llevó a cabo con unas concentraciones de los anticuerpos primarios (Ac 1º) anti-NCAM y anti-PSA, y de sus correspondientes secundarios previamente determinadas en nuestro laboratorio. El bloqueo de la membrana se llevó a cabo en una solución de leche desnatada en polvo al 5% (p/v) y TWEEN-20 al 0,1% (p/v), en PBS 1X, durante 4 h, en condiciones de agitación y a temperatura ambiente. Finalizado el bloqueo para la identificación de NCAM, la membrana se incubó con el Ac 1º monoclonal de rata IgG2a anti-CD56 de ratón, a una dilución 1/750 en solución de bloqueo durante 13-14 h (*overnight*) en agitación y a 4°C. Una vez terminada la incubación se eliminaron los restos del Ac 1º no unido a la membrana. Para ello, se realizaron 5 lavados de 5 min cada uno con la solución de bloqueo anterior, en agitación y a temperatura ambiente.

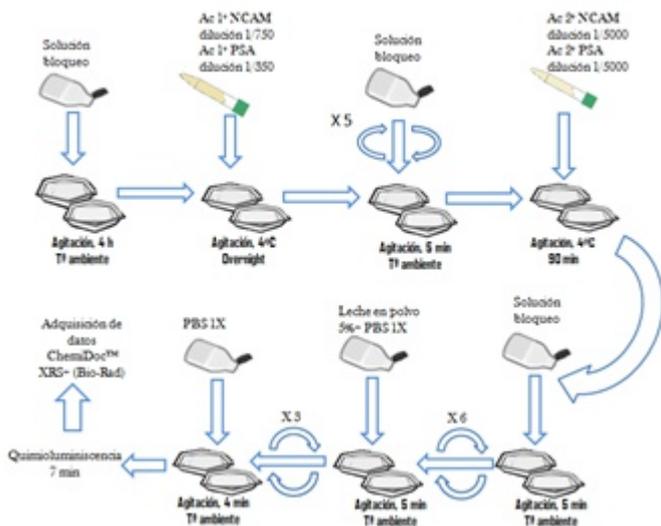


Figura 3. Proceso de realización del inmunoblot para detectar PSA y NCAM.

Posteriormente se incubó la membrana durante 90 min con el Ac 2º, policlonal de cabra anti-IgG-FC de rata conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) a una dilución 1/5000, a temperatura ambiente y en agitación. Transcurrido este tiempo, se realizaron 6 lavados de 5 min cada uno, con la solución de bloqueo anteriormente descrita para eliminar el anticuerpo secundario no unido. A continuación se realizó un lavado de 5 min con leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en PBS 1X, y 3 lavados de 4 min cada uno con PBS 1X (figura 3).

Para el revelado de la membrana se utilizó el sustrato de quimioluminiscencia “ECL” Clarity™

Western ECL Sustrate (Bio-Rad), durante 7 min a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. Tras este tiempo, se tomaron imágenes de la membrana en el equipo Chemidoc™ XRS+ (Bio-Rad,) mediante el software ImageLab para su documentación y posterior análisis.

Un protocolo similar al descrito se siguió para la inmunodetección de PSA, pero con las siguientes modificaciones: el Ac 1º empleado fue el monoclonal anti-CD56 de ratón/humano purificado de rata a la dilución 1/350, y un anti-IgM-mu de rata purificada de cabra conjugado con peroxidasa de rábano con dilución 1/5000 como Ac secundario. El revelado para el PSA también fue por quimioluminiscencia.

La toma de imágenes de las membranas de inmunoblot y de los geles teñidos con plata se realizó con el equipo de Análisis de Imagen ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad) y el software ImageLab o CuanityOne® para las imágenes de 2D-PAGE.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis por 1D –PAGE de la expresión de NCAM en el tejido sano y tumoral de CCR

Tras el establecimiento de las condiciones idóneas para la realización del inmunoblot se procedió al análisis de la expresión de la proteína NCAM en especímenes de tejido sano y tumoral de pacientes con CCR. Los resultados obtenidos en todos los pacientes estudiados fueron similares, tal como se aprecia en el resultado tipo mostrado en la figura 4. En la imagen se observa la presencia de una única banda, bien definida, situada un poco por encima del marcador de masa molecular de 135 kDa. Esta banda aparece en todos los pacientes analizados, tanto en el tejido sano como en el tejido tumoral. Sin embargo, en ninguna ocasión se ha observado en el control negativo, en el cual se carga la misma muestra que en tumor y fue procesado igual que las otras bandas a excepción de que no se añadió el Ac 1º anti-NCAM.

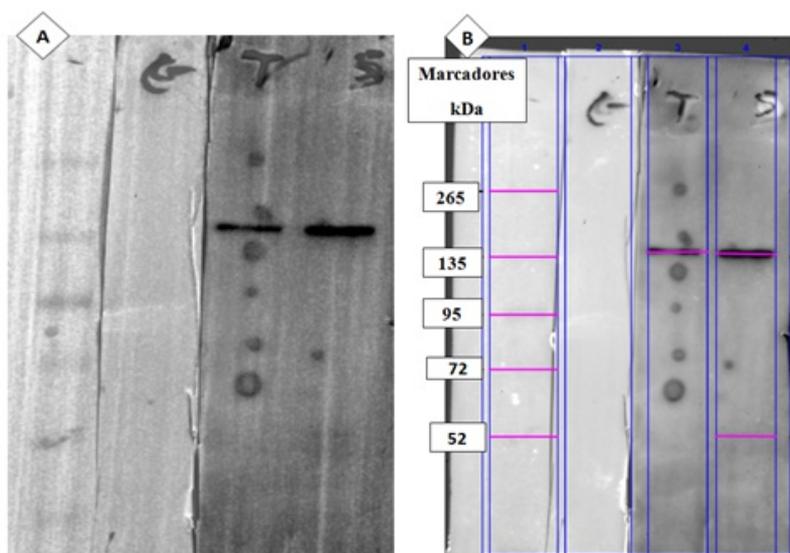


Figura 4. Imagen tipo de una electroforesis desnaturante monodimensional que ha sido transferida a membrana de PVDF y sobre la cual se ha realizado un inmunoblot para NCAM. En el primer carril se encuentran los marcadores de masa molecular. C-: control negativo.

Al contrario que en otros tejidos, en el tejido colorrectal adulto humano hasta el momento se acepta que la isoforma de NCAM que se expresa es la de 180 kDa (Roesler *et al.*, 1997; Huerta *et al.*, 2001), la cual ha sido incluso estudiada como un posible factor pronóstico para esta neoplasia en otros tejidos (Tascilar *et al.*, 2007). Sin embargo, los resultados obtenidos por nosotros sugieren que también se expresa la isoforma de 140 kDa (Figura 4). Es necesario mencionar que el anticuerpo anti-NCAM utilizado solamente detecta las dos isoformas de mayor peso molecular (140 kDa y 180 kDa), por lo que no podemos descartar que también se exprese la isoforma de 120 kDa. Este resultado aporta información suplementaria sobre la expresión de esta proteína en el tejido colorrectal, ya que hasta el momento los trabajos realizados indicaban la presencia en epitelio sano y tumoral del colon la isoforma de 180 kDa (Roesler *et al.*, 1997; Huerta *et al.*, 2001). Estos autores se basaron para llegar a dicha conclusión en las evidencias obtenidas por western blot de 5 líneas celulares (Huerta *et al.*, 2001) y en el análisis por RT-PCR de muestras de pacientes con CCR (Roesler *et al.*, 1997). Este último trabajo consiguió observar la expresión del exón 18 propio de la isoforma de mayor masa molecular. Nuestros resultados, por tanto, sin negar la posible existencia de la isoforma de 180 kDa en cantidades subdetectables, muestran sin ambages la presencia asimismo de la isoforma de 140 kDa de la NCAM. Al mismo tiempo comprobamos que, en caso de existir polisialilación en la NCAM, esta será muy baja, por dos razones. La primera de ellas es que, como se observa en la figura 4A, la banda de señal que se detecta corresponde a una banda y no a un rastro ancho y uniforme (smear) correspondiente a un rango más o menos amplio de masa molecular resultado de los grados variables de polisialilación de las diferentes moléculas de NCAM. La segunda razón es que la banda observada se corresponde a un peso molecular muy próximo a 140 kDa, lo que indica que la polisialilación de la isoforma predominante no es muy significativa.

Análisis por 2D-PAGE de la expresión de NCAM en tejido sano y tumoral de CCR

Una vez determinada la presencia de NCAM en el tejido colorrectal, procedimos a su estudio por 2D-PAGE para separar y analizar el conjunto de isoformas de esta molécula presentes en el tejido colorrectal de los pacientes con CCR.

El proceso de separación de la muestra opera durante la primera fase de IEF según las diferencias en punto isoeléctrico (pI) de las proteínas de la muestra, mientras que la SDS-PAGE posterior lo hace en base a las diferencias en masa molecular. La figura 5 muestra el resultado obtenido a partir de un espécimen de tejido tumoral de un paciente de CCR. La carga de proteína en el inmunoblot fue de 80 µg. El procesamiento de la imagen realizado con el programa *QuantityOne*® permite apreciar las características de la molécula NCAM; el peso molecular que se obtiene con la referencia de los marcadores de peso moléculas (Figura 5A) y también hacer una estima del pI de la molécula.

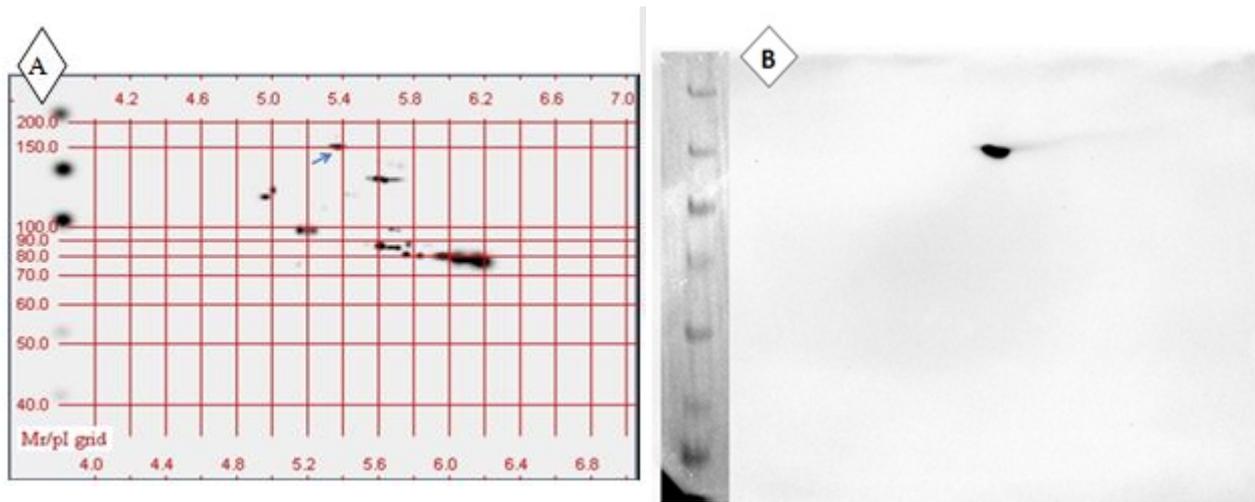


Figura 5. Separación mediante 2D-PAGE de un espécimen de tejido tumoral de CCR. (A). Mapa de masa molecular (Y) y pI (X) realizado sobre la imagen gaussiana del gel 2D-PAGE una vez superpuesto a la membrana de PVDF. La flecha indica el spot que el programa asocia con la NCAM. (B) Inmunoblot para NCAM en membrana de PVDF y revelado por quimioluminiscencia.

El estudio mediante 2D-PAGE (Figura 5) nos ha permitido observar la variabilidad de isoformas de la NCAM en los especímenes de tejido colorrectal analizados y determinar el rango de pI de estas, que ha resultado similar al descrito en un estudio anterior (Vawter et al., 1998).

Detección de NCAM y PSA en un espécimen de tejido tumoral de CCR

En las condiciones descritas se procedió al análisis para la expresión de NCAM y PSA en un espécimen de tejido tumoral de un paciente operado de CCR. El análisis para NCAM no dio lugar a señal positiva en el inmunoblot, pero sí se detectó señal en el inmunoblot de PSA, con una masa molecular de 63,1 kDa y pI 5,19, 5,22 y 5,25 (Figura 6).

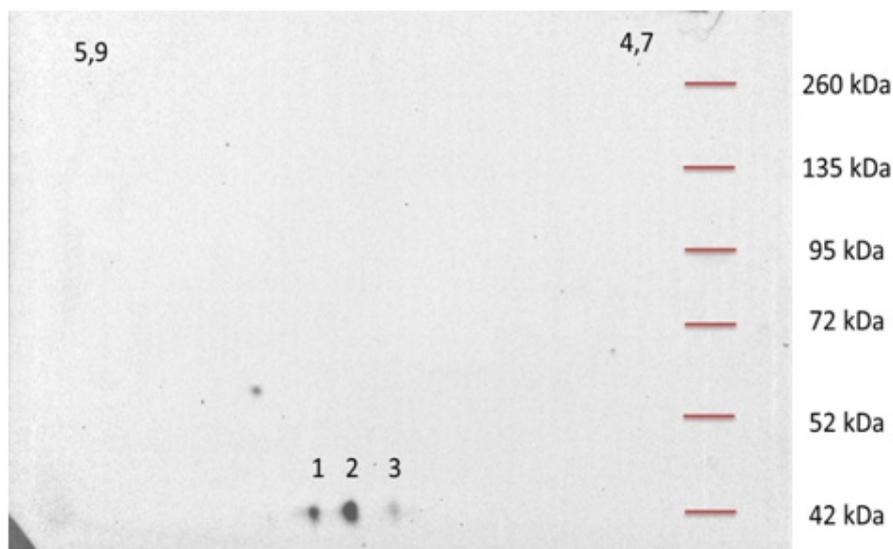


Figura 6. Inmunoblot de PSA, en el que se observan 3 spots bien definidos de ~40,7 kDa y pI 5,35, 5,26 y 5,2. Especimen de tejido tumoral de CCR, 100 µg de carga proteica.

La señal de peso molecular detectada para el PSA, demasiado baja para tratarse de PSA-NCAM, podría ser resultado por el contrario de la rotura de la cadena de PSA de la NCAM, de cuya labilidad se tienen evidencias previas (Schauer, 1982). Así, el PSA unido a NCAM puede resultar fácilmente degradado durante la SDS-PAGE, por ejemplo al hervir a pH neutro la proteína nativa (Hoffman et al., 1982; Key y Akeson, 1990) o incluso durante la congelación por periodos prolongados (citado por Manzi et al., 1994 de una observación no publicada de Higa y Varki). Por otro lado, resultados (no publicados) de nuestro laboratorio han acreditado altos índices de polisialilación en esta proteína en el tejido colorrectal de pacientes con CCR, compatibles con la masa molecular de estos spots y con el grado de elongación que se le supone al PSA en vertebrados (Rothbard et al., 1982; Angata & Fukuda, 2003). Otra posibilidad interesante, que no debe ser descartada, es que estos spots correspondan a alguna de las polisialiltransferasas responsables de la polisialilación del PSA, PST (Eckhardt et al., 1995; Angata et al., 1997) y SXT (Livingston y Paulson, 1993; Angata et al., 1997), ya que ambas poseen capacidad de autopolisialilación (Close & Colley, 1998) y sus masas moleculares rondan el valor de los spots del inmunoblot de PSA (Simon et al., 2013). Tanto una como otra posibilidad captaron nuestro interés por tratarse de observaciones no referidas hasta la fecha en humanos y se consideró por ello que merecían indagarse de reproducirse en experimentos posteriores.

El conjunto de los 5 casos analizados no ha permitido detectar diferencias de expresión de la NCAM entre el tejido sano y tumoral de los pacientes con CCR. Sin embargo, se trata de muy pocos casos, por lo que los resultados no son suficientemente significativos y se necesita aumentar su número para establecer una generalización apoyada estadísticamente.

Este trabajo, por tanto, ha servido especialmente para poner a punto el método de detección de la PSA-NCAM y de separación de sus diferentes isoformas.

CONCLUSIONES

En la introducción del tema se ha comentado la importancia de la proteína NCAM y de su grado de polisialilación, así como los antecedentes disponibles sobre su expresión en el tejido colorrectal y su aparente relación con el CCR. Por ello, nos marcamos como objetivo de este trabajo la puesta en marcha de un protocolo que nos permitiera la identificación de las diferentes isoformas de la NCAM en dicho tejido, teniendo en mente que hasta la fecha no existen estudios específicos sobre este aspecto y que los avances en el conocimiento de su microheterogeneidad y perfil de expresión en el tejido sano y tumoral de estos pacientes debe ayudar a mejorar el conocimiento de la biología funcional de la NCAM y a establecer de modo definitivo su potencial como biomarcador del CCR. Tras la realización del trabajo propuesto, los resultados obtenidos nos permiten enunciar las siguientes conclusiones:

- Se ha conseguido un protocolo para la separación y detección de las diferentes isoformas de la NCAM en especímenes de tejido colorrectal procedente de pacientes operados de CCR, que ha demostrado resultados positivos en inmunoblot para NCAM y PSA.
- En tejido colorrectal humano se ha observado la expresión de una isoforma de NCAM diferente a la que hasta el momento se había documentado en CCR.

BIBLIOGRAFÍA

- Angata, K., Fukuda, M. (2003). Polysialyltransferases: major players in polysialic acid synthesis on the neural cell adhesion molecule. *Biochimie* 85:195-206.
- Angata, K., Nakayama, J., Fredette, B., Chong, K., Ranscht, B., Fukuda, M. (1997). Human STX polysialyltransferase forms the embryonic form of the neural cell adhesion molecule: tissue-specific expression, neurite outgrowth, and chromosomal localization in comparison with another polysialyltransferase, PST. *J. Biol. Chem.* 272: 7182-7190.
- Barton, C.H., Mann, D.A., Walsh, F.S. (1990). Characterization of the human N-CAM promoter. *Biochem. J.* 268: 161-168.
- Berezin, V. (2010) Structure and function of the Neural cell adhesion molecule NCAM. *Adv. Exper. Med. and Bio.* ISBN 978-1-4419-1170-4.
- Cavallaro, U. Christofiri, G. (2004). Cell adhesion and signaling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4: 118-132.
- Close, B. E., Colley, K. J. (1998). In vivo autopolysialylation and localization of the polysialyltransferases PST and STX. *J. Biol. Chem.* 273: 34586-34593.
- Eckhardt, M., Muhlenhoff, M., Bethe, A., Koopman, J., Frosch, M., Gerardy-Schahn, R. (1995). Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1. *Nature* 373:715-718.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, JWW., Comber, H., Forman, D., Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur. J. Cancer* 49:1374-1403.
- Fernández-Briera, A., García-Parceiro, I., Cuevas, E., Gil-Martín, E. (2010). Effect of Human Colorectal Carcinogenesis on the Neural Cell Adhesion Molecule Expression and Polysialylation. *Oncology* 78: 196-204.
- Gascon, E., Vutskits, L., Kiss, J.Z. (2007). Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. *Brain. Res. Rev.* 56: 101-118.
- Hoffman, S., Sorkin, B. C., White, P. C., Brackenbury, R., Mailhammer, R., Rutishauser, U., Cunningham, B.A., Edelman, G.M. (1982). Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from embryonic brain membranes. *J. Biol. Chem.* 257: 7720-7729.
- Huerta, S., Srivatsan, E.S., Venkatesan, N. Peters, J., Moatamed, F., Renner, S., Livingston, E. H. (2001). Alternative mRNA splicing in colon cancer causes loss of expression of neural cell adhesion molecule. *Surgery* 130: 834-843.
- Key, B., Akeson, R. A. (1990). Olfactory neurons express a unique glycosylated form of the neural cell adhesion molecule (N-CAM). *J. Cell. Biol.* 110: 1729-1743.
- Livingston, B. D., Paulson, J.C. (1993). Polymerase chain reaction cloning of a developmentally regulated member of the sialyltransferase gene family. *J. Biol. Chem.* 268: 11504-11507.
- Manzi, A. E., Higa, H. H., Diaz, S., Varki, A. (1994). Intramolecular self-cleavage of polysialic acid. *J. Biol. Chem.* 269: 23617-23624.
- Nakayama, J., Angata, K., Ong, E., Katsuyama, T., Fukuda, M. (1998). Polysialic acid, a unique glycan that is developmentally regulated by two polysialyltransferases, PST and STX, in the central nervous system: from biosynthesis to function. *Pathol. Int.* 48: 665-677
- Nguyen, C., Mattei, M.G., Mattei, J.F., Santoni, M.J., Goridis, C., Jordan, B.R. (1986). Localization of the human NCAM gene to band q23 of chromosome 11: the third gene coding for a cell interaction molecule mapped to the distal portion of the long arm of chromosome 11. *J. Cell. Biol.* 102: 711-715
- Owens, G.C., Edelman, G.M., Cunningham, B.A. (1987) Organization of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) gene: alternative exon usage as the basis for different membrane associated domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 294-298.
- Rademacher, T.W., Parekh, R.B., Dwek, R.A. (1988). *Glycobiology. Annu. Rev. Biochem.* 57: 785-838.
- Roesler, J., Srivatsan, E., Moatamed, F., Peters, J., Livingston, E.H. (1997). Tumor suppressor activity of neural cell adhesion molecule in colon carcinoma. *Am. J. Surg.* 174: 251-257.

- Rothbard, J. B., Brackenbury, R., Cunningham, B.A., Edelman, G. M. (1982). Differences in the carbohydrate structures of neural cell-adhesion molecules from adult and embryonic chicken brains. *J. Biol. Chem.* 257: 11064-11069.
- Rutishauser, U. (2008). Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nature Rev. Neurosci.* 9: 26-35.
- Rutishauser, U., Brackenbury, R., Edelman, G.M. (1978). Cell-adhesion molecule from neural tissues of the chick embryo. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 14: 305-316.
- Schauer, R. (1982). Sialic acids: chemistry, metabolism and function. *J. Cell Biol. Monographs*, Vol 10. Springer-Verlag.
- Seifert, A., Glanz, D., Glaubitz, N., Horstkorte, R., Bork, K. (2012). Polysialylation of the neural cell adhesion molecule: interfering with polysialylation and migration in neuroblastoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 524: 56-63.
- Simon, P, Baümer, S., Busch, O., Röhrich, R., Kaese, M., Richterich, P., Wehrend, A., Müller, K., Gerardy-Schahn, R., Mühlenhoff, M., Geyer, H., Geyer, R., Middendorff, R., Galuska, S. P. (2013) Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM and the polysialyltransferase ST8SialII. *J. Biol. Chem.* 288: 18825-18833.
- Smith, P. K, Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, FH., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. K., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analit. Biochem.* 150: 76-85.
- Tascilar, O., Karadeniz, G., Ozel, I., Ugur, A., Hamdi, B., Irkorucu, O., Karakaya, K., Gül, M., Bülent, H., Comert, M. (2007). Neural cell adhesion molecule-180 expression as a prognostic criterion in colorectal carcinoma: Feasible or not? *World J. Gastroenterol.* 13(41): 5476-5480.
- Thiery, J.P., Brackenbury, R., Rutishauser, U., Edelman, G.M. (1977). Adhesion among neural cell of the chick embryo. *J. Biol. Chem.* 252: 6841-6845.
- Vawter, M., Hemperly, J.J., Hyde, T., Bachus, S. E., Vanderputtern, D., Howard, A., Cannon-Spoor H.E., McCoy, M., Webster, M.J., Kleinman, J., Freed, W. J. (1998). VASE-Containing N-CAM Isoforms are increased in the hippocampus in bipolar disorder but not Schizophrenia. *Exp. Neurol.* 154: 1-11.
- Von der Ohe, M., Wheeler, S.F., Wuhrer, M., Harvey, D., Liedtke, S., Mühlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R., Geyer, H., Dwek, R., Geyer, R., Wing, D., Schachner, M. (2002). Localization and characterization of polysialic acid containing N-linked glycans from bovine NCAM. *Glycobiology* 12: 47-63.
- Wilson, H.V. (1907). On some phenomena of coalescence and regulation in sponges. *J. Exp. Zool.* 5: 245-258.