

*“Búsqueda de nuevos marcadores
moleculares en dos modelos de
cáncer.”*

Laura Capandeguy

Orientador de Tesis: Dra. Nora Berois

Laboratorio de Glicobiología e Inmunología Tumoral

Institut Pasteur de Montevideo

Julio 2011

Agradecimientos

Me gustaría agradecer en primer lugar a mi papá a mi mamá y a Mai porque gracias a su apoyo, su continua motivación, su fe en mi siempre, porque gracias a ellos logré todo esto y por su cariño siempre.

A Andrés por su cariño, por el aguante en todo momento, por su confianza en mi y por su amor.

Al abuelo Luis y la abuela Nely por todo el apoyo siempre y su gran interés en cada momento.

Al tío pingüino también por su apoyo y por muchos cuentos divertidos.

A la tía Julia por todo su interés a pesar de estar tan lejos.

A Nora y Eduardo por la oportunidad de trabajar en un laboratorio tan importante y poder ser parte de ese grupo, por la paciencia y por enseñarme todo lo posible.

A todos los compañeros del laboratorio especialmente Lechu, Flor y Mariana que me ayudaron un montón y por compartir momentos muy buenos juntas.

A Sonia, Beba, Vero y Héctor por el interés siempre, en cada paso de esta etapa.

A Flo y Vico por hacer del primer año en facultad más fácil y más lindo, por todos los días juntas y disfrutando cada momento, a Cami y Ces por los siguientes años también en facultad, compartiendo cada ratito que podíamos, y a Yani porque a pesar de no seguir lo mismo su gran interés y apoyo siempre, y por supuesto a todas por una amistad de tantos años y su compañía siempre.

A los amigos y compañeros de facultad que lograron que estos años fueran más fáciles y divertidos. Especialmente a la negrita por todos esos mates, charlas y exámenes juntas, a Lía por todos los laboratorios, informes y comidas juntas y a Maia por los recreitos con charlas hermosas, y por supuesto a todas por hacer de esto algo mucho más lindo.

A Marcelo, Vale y Rocío por todos los fines de semana divertidos y las idas para afuera juntos.

A Vicky y Vera por las tardes entretenidas de inglés.

Al T.E.O. por ser parte de esto también.

Me gustaría dedicárselo a la abuela Bea que estaría más que orgullosa en este momento.

Índice

Resumen	1
1. Introducción	
1.1 Cáncer	2
1.1.1 El proceso	2
1.1.2 Estadísticas	6
1.1.3 Neuroblastoma	7
1.1.4 Cáncer de pulmón	8
1.2 Glicosilaciones	11
1.2.1 Glicosiltransferasas	11
1.2.2 O-glicosilación	12
1.2.3 Mucinas	13
1.2.4 ppGalNAc-Transferasas	15
1.3 Glicosilación y Cáncer	19
1.3.1 Alteración en la expresión y glicosilación de mucinas	20
1.3.2 Alteración de las ppGalNAc-Transferasas	23
2. Objetivos	
2.1 Objetivos generales	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. Materiales y Métodos	
3.1 Líneas celulares	25
3.1.1 Líneas celulares de Neuroblastoma	25
3.1.2 Líneas celulares de Cáncer de pulmón	26
3.2 Extracción de ARN	26
3.3 RT-PCR	27
3.3.1 Síntesis de cDNA	27
3.3.2 Amplificación por PCR	27
3.4 Western Blot	29
3.4.1 Preparación de extractos celulares	29
3.4.2 Western Blot	29
3.5 Electroforesis Bidimensional	30
3.5.1 Preparación de extracto celular	30
3.5.2 Primera dimensión: Isoelectroenfoque	31
3.5.3 Segunda dimensión: SDS-PAGE	31
3.5.4 Tinción con nitrato de plata	31
4. Resultados	
4.1 Neuroblastoma	32
4.2 Cáncer de pulmón	35
4.2.1 RT-PCRs	35
4.2.2 Western Blot	38
4.2.3 Electroforesis Bidimensional	40

5. Discusión	42
5.1 Neuroblastoma	43
5.2 Cáncer de pulmón	44
6. Conclusiones y perspectivas	45
7. Referencias bibliográficas	46

Resumen

La profundización en el conocimiento del proceso de oncogénesis está permitiendo la identificación de nuevas moléculas de relevancia, tanto por su utilidad como marcadores como blancos moleculares, que están revolucionando la práctica de la oncología actual y esto se puede ver reflejado en los resultados clínicos. Algunos tumores representan un verdadero problema de salud pública, como por ejemplo el cáncer de pulmón que es el tumor más común en hombres y con incidencia creciente en mujeres, siendo la causa más frecuente de muerte por cáncer, así como el neuroblastoma, tumor sólido extracraneano de gran frecuencia, generalmente diagnosticado en etapas avanzadas, con más del 50% de mortalidad. La *O*-glicosilación de las proteínas se encuentra frecuentemente desregulada en el cáncer, pudiendo explicar ciertos cambios de las propiedades biológicas de las células tumorales y poco se conoce de este complejo proceso en estos dos modelos tumorales. Ante la hipótesis que esta alteración esté ocasionada por una desregulación de las enzimas que catalizan el proceso, el estudio de la familia UDP-N-acetil-D-galactosamina:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasas, enzimas que catalizan el primer paso de la síntesis de *O*-glicanos, han despertado interés como marcadores tumorales. Se ha sugerido el potencial interés como marcador pronóstico de ppGalNAc-T3 en diferentes tumores y nuestro grupo ha aportado evidencias sobre la expresión aberrante de ppGalNAc-T6 en cáncer de mama y gástrico, así como la sobreexpresión de ppGalNAc-T13 en asociación con el potencial agresivo del neuroblastoma. En el presente trabajo se buscó profundizar en el conocimiento de la expresión de esta familia de enzimas en cáncer de pulmón y neuroblastoma. Se comprobó que si bien muchas de las isoenzimas presentan una expresión ubicua, algunas tienen expresión diferencial en diferentes líneas celulares representativas de diferentes tipos histológicos y establecidas a partir de tumores en diferentes estadios. De particular interés es la constatación en algunos casos de una expresión excluyente de ppGalNAc-T9 y -T13, así como datos que sugieren una correlación con el comportamiento biológico de ambos tumores. La profundización en la caracterización de ambas isoformas tanto por técnicas de biología molecular como inmunológicas en líneas celulares y muestras clínicas será fundamental para confirmar la hipótesis y establecer el verdadero valor de estas moléculas como biomarcadores de utilidad clínica.

1. Introducción

1.1 Cáncer

1.1.1 *El proceso*

La carcinogénesis es un proceso mucho más complicado de lo que parecía ser hace una década atrás. El estudio del genoma de las células humanas tumorales ha revelado un número de modificaciones genéticas y epigenéticas mucho más elevado que el esperado. La demora entre el primer evento de iniciación y la manifestación del cáncer puede ser muy larga, hasta de más de 60 años. Esta demora tan larga demuestra como los factores de riesgo durante la infancia merecen un análisis crítico (Tubiana, 2008).

La investigación del cáncer ha generado un complejo conocimiento del mismo, revelando que es una enfermedad que involucra cambios dinámicos en el genoma. El fundamento de esto se debe al descubrimiento de mutaciones que activan oncogenes con una dominante ganancia de función y genes supresores de tumores con una recesiva pérdida de función; ambos tipos de genes fueron identificados en células cancerígenas humanas y animales (Hanahan et al., 2000). El cáncer además de ser causado por alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores, es también causado por alteraciones en genes de microRNA. Estas alteraciones son por lo general eventos somáticos, a pesar de que las mutaciones en la línea germinal puede predisponer a una persona a cáncer hereditario o familiar (Croce, 2008). Se ha demostrado que cuando el inicio temprano del cáncer afecta a varias generaciones se debe a factores hereditarios que son una importante causa de cáncer (Foulkes, 2008).

Diferentes líneas de evidencia indican que en humanos la tumorigénesis es un proceso de muchos pasos que reflejan las alteraciones genéticas que llevan a la transformación progresiva de las células normales a derivados altamente malignos (Hanahan et al., 2000).

Los tumores por lo general poseen citogenéticamente diferentes clones que surgen de la célula inicial transformada que luego pasan por alteraciones genéticas secundarias y terciarias. Esta heterogeneidad contribuye a las diferencias en el comportamiento clínico y la respuesta a los tratamientos de los tumores

diagnosticados como del mismo tipo. Además de estos clones y subclones iniciales, los tumores pueden contener células cancerígenas progenitoras, todas estas constituyen un espectro de células con diferentes alteraciones genéticas y diferentes estados de diferenciación. Estas poblaciones pueden diferir en la sensibilidad a la quimioterapia, radioterapia, y otros tratamientos, provocando de esta forma que el tratamiento clínico sea complicado (Croce, 2008).

Es debido a todo esto que el desarrollo de los tumores presenta un proceso análogo a la evolución Darwiniana, mediante el cual el éxito de los cambios genéticos, cada uno confiriendo una u otra ventaja en el crecimiento, lleva a la progresiva conversión de una célula humana normal a una cancerígena (Gerlinger and Swanton, 2010).

Por otro lado, el sistema inmune puede responder a las células cancerígenas. Esta respuesta se puede dar de 2 formas diferentes: reaccionando en contra de los antígenos específicos del tumor (moléculas que son únicas de células cancerígenas) o en contra de antígenos asociados a tumores (moléculas que son expresadas de diferentes formas por células cancerígenas y células normales) (Finn, 2008).

La metástasis es un proceso que consiste en diferentes etapas: la célula tumoral escapa del tumor primario, invasión a los vasos, migración, adhesión al endotelio vascular, extravasación y colonización, todos de los cuales son esenciales en el desarrollo clínico de la metástasis (Nguyen, 2011).

Recientemente, se ha revelado que la biología de los tumores no puede ser simplemente entendida enumerando los rasgos de las células cancerígenas, sino que debería también abarcar las contribuciones del “microambiente tumoral” que se construye durante la tumorigénesis (Figura 1.1.1-1). Las células cancerígenas son la base de la enfermedad; estas inician los tumores y dirigen la progresión mediante las mutaciones oncogénicas y las mutaciones de los genes supresores de tumores. Tradicionalmente estas células cancerígenas han sido conocidas como poblaciones celulares homogéneas hasta bastante tardíamente en la progresión del tumor, cuando la hiperproliferación combinada con la creciente inestabilidad genética dan lugar a los distintos clones de las subpoblaciones. Sin embargo, recientemente se ha demostrado la existencia de una nueva dimensión de heterogeneidad intratumor y una subclase de células neoplásicas en tumores, conocidas como células madres cancerígenas (CSCs, cancer stem cells). Los orígenes de estas células en los tumores no es claro aún por lo

que puede variar entre diferentes tumores. En algunos tumores, las células madres normales pueden servir como las células de origen que pueden sufrir luego transformación oncogénica para dar lugar a las CSCs, mientras que en otros tumores células progenitoras parcialmente diferenciadas pueden sufrir la transformación oncogénica inicial y luego adquirir características de tipo célula madre. Las células endoteliales también son parte del “microambiente tumoral”, formando la vasculatura asociada a los tumores. Se ha demostrado una diferencia en la expresión de genes asociados a las células endoteliales normales y las tumorales. Los pericitos son células que envuelven los vasos sanguíneos y colaboran con las células endoteliales a sintetizar las membranas de la base endotelial. Además en este microambiente se pueden encontrar células del sistema inmune inflamatorio que son consideradas como constituyentes de los tumores, ya que pueden actuar como promotoras de tumores o antagonistas de tumores. Los fibroblastos se encuentran en proporciones diferentes, en la mayoría de los carcinomas, constituyendo en muchos casos las poblaciones celulares preponderantes del estroma tumoral. Hay al menos dos tipos diferentes de células tipo fibroblastos, las células similares a los fibroblastos que crean la base estructural que soporta a la mayoría de los tejidos epiteliales y a los miofibroblastos que tienen roles biológicos muy diferentes a los anteriores (Hanahan and Weinberg, 2011).

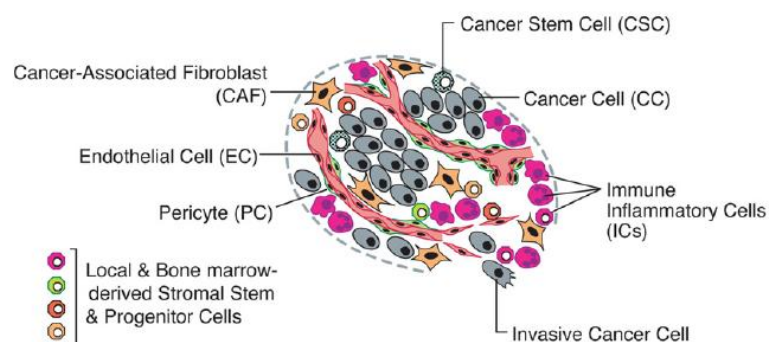


Figura 1.1.1-1: La mayoría de las células que forman el “microambiente tumoral”. (Tomada de Hanahan and Weinberg, 2011).

Hay más de 100 tipos diferentes de cáncer, y se encuentran distintos subtipos de éstos en diferentes órganos. La gran cantidad de genotipos del cáncer se deben a la manifestación de seis alteraciones esenciales en la fisiología que juntas llevan a un

crecimiento maligno (Figura 1.1.1-2): Su propia generación de factores de crecimiento, insensibilidad de señales inhibitorias de crecimiento, evasión de los programas de muerte celular (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, e invasión tisular y metástasis. Cada uno de estos cambios fisiológicos representa un incumplimiento de un mecanismo de defensa contra el cáncer (Hanahan et al., 2000).

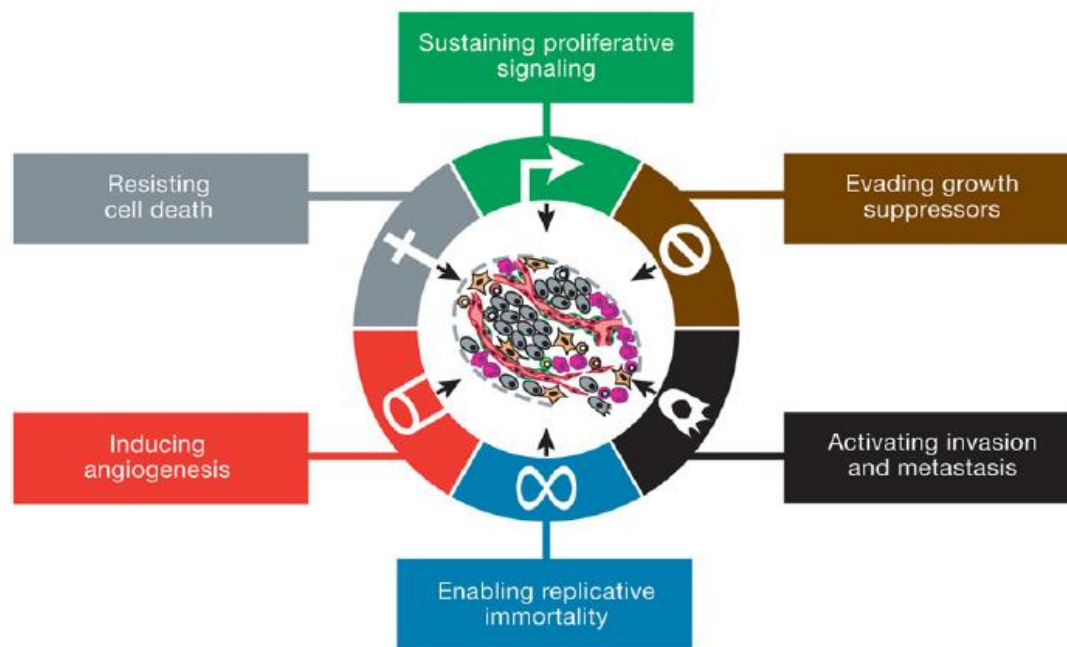


Figura 1.1.1-2: Capacidades adquiridas de la gran mayoría de los tipos de cáncer durante su desarrollo. (Tomada de Hanahan and Weinberg, 2011).

Se han empezado a considerar dos alteraciones diferentes más que están involucradas en la patogénesis. Una involucra la capacidad de modificar, o reprogramar el metabolismo celular para una proliferación neoplásica más eficiente. La segunda permite que las células cancerígenas evadan la destrucción por el sistema inmune, especialmente por los linfocitos T y B, macrófagos y las células asesinas naturales. Como estas características no han sido generalizadas ni completamente validadas, son clasificadas como características emergentes. Por otro lado, dos características de la neoplasia facilitan la adquisición de las seis características antes mencionadas, como la de las dos características emergentes. La inestabilidad genética en las células cancerígenas, que generan mutaciones al azar incluyendo a los rearrreglos

cromosomales facilitan la progresión tumoral y la inflamación por las células del sistema inmune innato, normalmente designadas para luchar contra las infecciones, pueden en cambio facilitar la progresión tumoral de varias formas (Figura 1.1.1-3)(Hanahan and Weinberg, 2011).

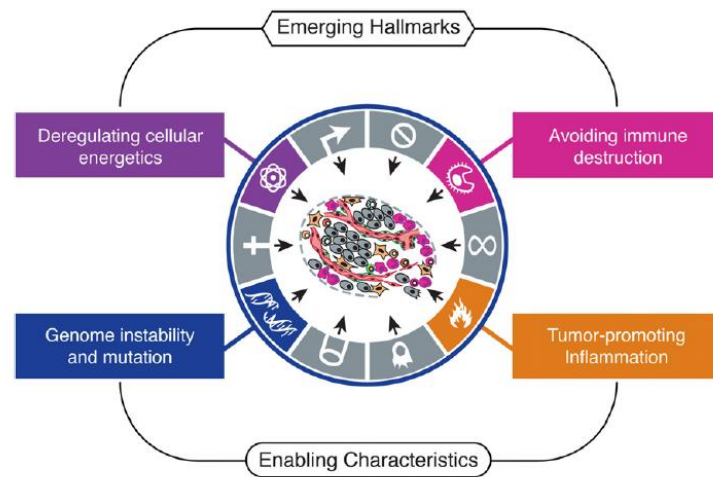


Figura 1.1.1-3: Características emergentes y características que facilitan las capacidades adquiridas y a las mismas características emergentes. (Tomada de Hanahan and Weinberg, 2011)

1.1.2 Estadísticas

El cáncer es un gran problema de salud pública en el mundo, en Estados Unidos por ejemplo, 1 de cada 4 muertes es causada por esta enfermedad. Sin embargo, considerando estadísticas recientes de todos los tipos de cáncer, las tasas de mortalidad de éste ha disminuido en 2.6% por año para hombres y un 1.8% para mujeres desde 2002 a 2004 (Jemal et al., 2010). La incidencia de cáncer también ha disminuido significativamente. Estos resultados se observan tanto en hombres como en mujeres y en poblaciones étnica y racialmente diferentes. La disminución se debe principalmente a los declives en los 3 principales tipos de cáncer en hombres (pulmón, colorrectal y próstata) y por 2 de los 3 cánceres líderes en mujeres (mama y colorrectal). Es posible que esta disminución se deba en gran parte a los avances tecnológicos ya que gracias a ellos se ha logrado mejorar el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad (Jemal et al., 2008).

1.1.3 Neuroblastoma

Neuroblastoma es un tumor responsable de un 8-10% de la patología oncológica en pacientes menores de 15 años, y aproximadamente un 15% de todas las muertes oncológicas pediátricas, y al contrario de otros cánceres pediátricos, ésta es fatal en al menos la mitad de los pacientes diagnosticados (Janoueix-Lerosey et al., 2010; Vermeulen et al., 2010).

Se trata de un tumor embrional derivado de las células primitivas del sistema nervioso autónomo, es el tumor sólido extracraneal diagnosticado más frecuentemente durante la infancia (Brodeur, 2003; Maris et al., 2007; Maris, 2010).

Originándose desde el sistema nervioso simpático en desarrollo, el neuroblastoma primario se localiza frecuentemente en el abdomen (65%), generalmente en la glándula adrenal o en cualquier sitio anatómico en donde hay tejido nervioso simpático (Brodeur, 2003).

El comportamiento biológico de neuroblastomas es extremadamente variable, y en ciertos aspectos único. Los neuroblastomas tienden a tener una regresión espontánea en una porción de los infantes o a diferenciarse en un ganglioneuroma benigno en pacientes mayores. Desafortunadamente, en la mayoría de los pacientes ya hay metástasis a la hora del diagnóstico, y generalmente experimenta una rápida progresión con un destino fatal (Westermann and Schwab, 2002).

Los neuroblastos pueden pertenecer a tres genotipos diferentes, que se conocen como N (neuroblásticos, de comportamiento biológico más agresivo, con mayor proliferación, clonogenicidad y tumorigénicos), los de tipo S (con mayor adherencia al sustrato y menor agresividad biológica) y los de tipo I (que poseen características intermedias) (Ross et al., 2003).

A pesar de que los síntomas son muy variables, y dependen del sitio del tumor primario, como de la presencia o ausencia de metástasis o síndromes paraneoplásicos, se pueden reconocer tres escenarios clínicos principales: a) tumores localizados, representan aproximadamente el 40% de los casos (descubrimiento incidental de una masa intraadrenal en un ultrasonido prenatal, o tumor localizado en algún lugar de la cadena simpática); b) tumores metastáticos, aproximadamente la mitad de los pacientes tienen metástasis al momento del diagnóstico, y en general tienen una gran carga tumoral; y c) 4S, representa un fenotipo especial (S=special) que ocurre en

aproximadamente 5% de los casos y a pesar de estar diseminados son de buen pronóstico. Estos casos se ven en el lactante y poseen tumores primarios localizados con metástasis exclusivamente en el hígado, piel o médula ósea, que casi siempre tiene una regresión espontánea (Maris et al., 2007).

Los mecanismos que llevan a los diversos comportamientos clínicos de los neuroblastomas no son claros. Debido al análisis de los tumores desde un nivel molecular y citogenético, cambios genéticos no al azar han sido identificados, incluyendo cambios en la ploidía, amplificación del oncogen MYCN, deleciones en el cromosoma 1p, ganancias en el brazo del cromosoma 17q, deleciones de 11q como otras regiones genómicas que permiten que los tumores sean clasificados en subconjuntos con distintas características biológicas y comportamientos clínicos (Westermann and Schwab, 2002).

Muchos genes y las vías de señalización que se encuentran alterados en la mayoría de los carcinomas por lo general no lo están en neuroblastoma, a excepción del gen MYCN que se encuentra desregulado y su amplificación ha demostrado ser un marcador pronóstico independiente que guía las decisiones terapéuticas (Maris et al., 2007).

1.1.4 Cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón es el cáncer más común en el mundo con 1.35 millones de nuevos casos, representando el 12.4% de todos los nuevos tipos de cáncer. Es también la causa de muerte más frecuente, con 1.18 millones de muertes, o un 17.6% de muertes por cáncer en el mundo entero. Mundialmente es por mucho el cáncer más común en hombres con las mayores tasas observadas en Norte América y Europa. Altas tasas también se observan en Australia/Nueva Zelanda y en el este de Asia (China y Japón). En mujeres la incidencia es menor, pero se encuentran en aumento, siendo las tasas más altas en Norte América y en el norte de Europa. Los patrones geográficos de prevalencia para este cáncer están influenciados por la exposición al tabaco, siendo diferentes en mujeres y en hombres, con un 47% y un 85% respectivamente debidos a esta causa (Parkin et al., 2005). Considerando las estadísticas más recientes la tasa de mortalidad en cáncer de pulmón en hombres está decreciendo, pero en mujeres sigue aumentando en un 0.2% por año desde 1995 a 2004. Estas diferencias se observan

debido a diferencias históricas en el hábito de fumar entre hombres y mujeres (el tabaquismo comenzó en mujeres aproximadamente 20 años después que en hombres) (Jemal et al., 2010).

El cáncer de pulmón se puede clasificar en carcinoma de células pequeñas (SCLC, small cell lung carcinoma) o carcinoma de células no pequeñas (NSCLC, non-small cell lung carcinoma). NSCLC es histológicamente y clínicamente diferente del SCLC, y es subcategorizado en adenocarcinomas, carcinoma de células escamosas y carcinoma de células grandes (Bhattacharjee et al., 2001). Los adenocarcinomas son masas periféricas heterogéneas que se metastatizan tempranamente, y por lo general ocurren en pacientes con alguna enfermedad pulmonar subyacente (Travis et al., 1995). El carcinoma de células escamosas se trata típicamente de masas endobronquiales localizadas centralmente, que se pueden presentar con hemoptisis, neumonía post-obstruktiva, o colapso lobular. A diferencia de los adenocarcinomas, estas células por lo general se metastatizan tardíamente en el curso de la enfermedad (Patz, 2000). Los carcinomas de células pequeñas son clínicamente agresivos, por lo general se localizan centralmente con una implicación mediastínica y están asociados con una metástasis extratorácica temprana, incluyendo síndrome paraneoplásico. A pesar de su respuesta a la quimioterapia, este tipo de carcinoma ya está avanzado a la hora del diagnóstico, y los pacientes tienen un pronóstico pobre (Collins et al., 2007). Los carcinomas de células grandes son pobremente diferenciados. Estos tumores son masas periféricas grandes asociadas con una metástasis temprana (Travis et al., 1995).

Cada uno de estos tipos de cáncer de pulmón derivan de compartimentos diferentes en el pulmón: los carcinomas de células pequeñas, y los carcinomas de células escamosas y algunos adenocarcinomas (20%) surgen en el compartimento central de las vías respiratorias bronquiales a partir de una célula madre potencial, la célula bronquial basal, con capacidad de auto-renovación y proliferación (Brambilla and Gazdar, 2009).

A pesar de que aproximadamente 10 por ciento de los cánceres de pulmón pueden permanecer asintomáticos y ser detectados por radiografías de tórax, la mayoría de los pacientes ya presentan síntomas cuando son diagnosticados, los cuales pueden ser no específicos como fatiga, anorexia y pérdida de peso, así como signos y síntomas directos causados por el tumor primario, o por la propagación intratorácica o a

distancia. Una minoría de pacientes puede presentar síndromes paraneoplásicos (Collins et al., 2007).

El cáncer de pulmón se puede clasificar en diferentes estadios según la estadificación TNM, para los cuales el tratamiento es diferente (Nair et al., 2011).

Las decisiones que se toman para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón han sido basadas en la histología del tumor. La comprensión de la composición molecular de los tumores ha llevado al desarrollo de agentes dirigidos específicamente a estos. La identificación de mutaciones en genes importantes y la comprensión de sus efectos en la biología tumoral han suscitado gran interés y se encuentran en la base de nuevos desarrollos biotecnológicos de gran interés terapéutico (Pao and Girard, 2011). Estas nuevas terapias pueden ser dirigida a los genes como a vías de señalización. Entre las vías de señalización más comunes se encuentran las siguientes: vías promotoras de crecimiento (Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)/Ras/Phosphatidylinositol 3-Kinase), vías inhibitoras de crecimiento (p53/Rb/P14ARF, STK11), vías apoptóticas (Bcl-2/Bax/Fas/FasL), y las vías de reparación del ADN (Brambilla and Gazdar, 2009).

Los cambios epigenéticos en cáncer de pulmón pueden contribuir a la transformación celular por la modificación de las estructuras de cromatina y la expresión de genes específicos; entre estos se incluyen la metilación del ADN, la modificación proteica de las histonas y la cromatina, y micro-RNA, todos de los cuales son responsables del silenciamiento de los genes supresores de tumores, mientras aumentan la expresión de oncogenes (Brambilla and Gazdar, 2009).

Entre las vías de reparación de ADN, la de escisión de nucleótidos (NER) es una de las más importantes, y sus componentes han sido evaluados en cáncer de pulmón y otros cánceres como marcadores potenciales de resistencia al tratamiento. La proteína ERCC1 (Excision repair cross-complementation group 1), que pertenece a las vías NER, cuando presenta una sobreexpresión se asocia a una respuesta nula a ciertos tratamientos. Las proteínas RRM1 (Ribonucleotide reductase messenger 1) y BRCA1 (Breast cancer gene 1) también se conocen como posibles marcadores para este tipo de cáncer (Coate et al., 2009).

Alteraciones en proteínas claves que controlan el ciclo celular también son comunes en cáncer de pulmón, y constituyen importantes marcadores moleculares, como por

ejemplo, p53 (guardián del genoma), y KRAS un miembro de la familia Ras, que es parte de la traducción de señales y se encuentra mutado en un 30% de los adenocarcinomas (Coate et al., 2009).

La vía de EGFR regula la proliferación celular, angiogénesis, apoptosis y migración, y este receptor se encuentra muchas veces sobreexpresado en NSCLC (Coate et al., 2009). Este y otros genes pertenecientes a la familia de los receptores de tirosinas quinasas pueden presentar mutaciones activadoras que ocasionan ganancia de función (Pao and Girard, 2011).

1.2 Glicosilación

La glicosilación es un proceso postraduccional muy importante que involucra diferentes moléculas biológicas. Es el proceso por el cual se añade uno o más azúcares a una molécula proteica o lipídica (Burchell et al., 2001). La glicosilación proteica es un proceso muy conocido que tiene muchas consecuencias funcionales en el metabolismo de las proteínas que los poseen. Las vías de glicosilación mayores incluyen los O-glicanos; los oligosacáridos unidos por N-acetil-D-glucosamina a la asparginina, dando lugar a la familia de los N-glicanos y el anclaje de glicosilfosfatidilinositol (Patsos et al., 2007). Los glicoconjugados constituyen una clase importante de biomoléculas, que incluyen las glicoproteínas, glicoesfingolípidos y proteoglicanos. Los glicanos están involucrados en algunas condiciones fisiológicas y patológicas, como interacciones hospedero patógeno, diferenciación celular, migración, invasión tumoral y metástasis, tráfico celular y señalización (Reis et al., 2010).

1.2.1 Glicosiltransferasas

Las glicosiltransferasas se encuentran en el lumen del aparato de Golgi, utilizan compuestos azúcar-nucleótido, y añaden azúcares una a una a las proteínas (Alberts). El clonado y secuenciado de más de 500 genomas ha demostrado que las glicosiltransferasas son un tipo de enzima muy prevalente, que representan el 1-2% del genoma y más de 30.000 secuencias de éstas son conocidas entre todos los reinos (Rini et al., 2009).

El inicio de la biosíntesis de glicoproteínas y glicolípidos requiere de glicosiltransferasas que adhieran sacáridos ya sea a una cadena lateral de un aminoácido del polipéptido o a una base de esfingolípido. Entre las glicosiltransferasas que utilizan como sustratos a las proteínas o glicoproteínas, la cadena polipeptídica del aceptor es usada de diferentes formas para conferirle especificidad en la reacción de glicosilación. Todos los N-glicanos son iniciados por una oligosacariltransferasa, la cual transfiere el precursor del N-glicano a la asparagina en la secuencia con el motivo Asn-X-Ser/Thr. Sin embargo muchas enzimas pueden glicosilar los residuos de serinas y treoninas, transfiriendo un monosacárido específico a la cadena lateral de una de éstas, provocando que estos O-glicanos formen diferentes tipos de enlaces, ya sea O-GlcNAc, O-GalNAc, O-fucosa, O-manosa, O-xilosa. Entre estos enlaces la especificidad por una serina o una treonina particular es alcanzada de diferentes formas. Por ejemplo, las O-GalNAc transferasas poseen un dominio lectina que sirve para dirigir a la glicosiltransferasa a regiones del polipéptido que ya poseen cadenas de glicanos. De esta forma, las regiones del polipéptido que tienen un alto contenido de cadenas de glicanos (típico de estructuras tipo mucinas), pueden ser sintetizadas (Rini et al., 2009).

1.2.2 O-glicosilación

La O-glicosilación es una modificación covalente común en residuos de serina o treonina de glicoproteínas de mamíferos (Rini et al., 2009). En el aparato de Golgi se procesan las cadenas de los oligosacáridos. A medida que pasan por las cisternas de éste, en su camino desde el Retículo Endoplasmático (RE) a sus destinos finales, a las proteínas se le añaden azúcares a los grupos OH de las cadenas laterales de dichas serinas o treoninas. Este proceso está catalizado por una serie de enzimas conocidas como glicosiltransferasas (Alberts et al., 2004).

Los O-glicanos tienen funciones tan diversas como sus estructuras: contribuyen al mantenimiento de la estructura proteica, protegen a la glicoproteína de la degradación por proteasas, forman estructuras antigénicas, y participan de la adhesión célula-matriz y célula-célula involucrada en la fertilización, embriogénesis, crecimiento, desarrollo y apoptosis celular (Guo et al., 2004).

Un simple cambio en la estructura de uno de los glicanos agregado a las glicoproteínas o glicolípidos puede ser un rasgo común en el cambio hacia la malignidad (Burchell et al., 2001).

1.2.3 Mucinas

Las mucinas son glicoproteínas principalmente epiteliales de gran peso molecular con un gran contenido de oligosacáridos agrupados, unidos a repeticiones en tándem de péptidos ricos en treonina, serina, y prolina. Las *O*-glicosilaciones tipo mucina son una muy abundante forma de modificación postraduccional de proteínas encontradas en todo el reino animal (Hanisch, 2001; Byrd and Bresalier, 2004).

Las glicoproteínas mucinas se encuentran principalmente en secreciones mucosas en superficies epiteliales, incluyendo los tractos gastrointestinales, genitales y respiratorios, además de encontrarse también en fluidos corporales. Están conjugadas a carbohidratos, y las que son producidas por las células epiteliales, tanto de membranas mucosas como de glándulas salivales, contienen ácido siálico (Brockhausen et al., 2009).

En estas mucinas, los *O*-glicanos están enlazados covalentemente por un enlace α de un motivo *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) al –OH de la serina o treonina, por una unión *O*-glicosídica, y las estructuras formadas son las conocidas como *O*-glicanos mucinas, o *O*-GalNAc glicanos (Rini et al., 2009).

Los *O*-glicanos tipo mucinas en general están agrupados y se conocen por lo tanto como dominios mucina, que se encuentran como proteínas de membrana o formando parte de secreciones (Figura 1.2.3-1). Debido a la estructura extensa y rígida, inducida por la glicosilación, estos dominios tienen un rol importante en determinar la arquitectura total y la accesibilidad de la superficie celular de la glicoproteína. Por estos dominios agrupados, más del 50% del peso molecular de las mucinas se debe al componente de azúcar. Esta forma de glicosilación además impacta en una variedad de procesos biológicos, incluyendo la adhesión célula-célula, interacciones entre hospedero y patógeno y tráfico proteico intracelular (Pratt et al., 2004; Hang and Bertozzi, 2005) .

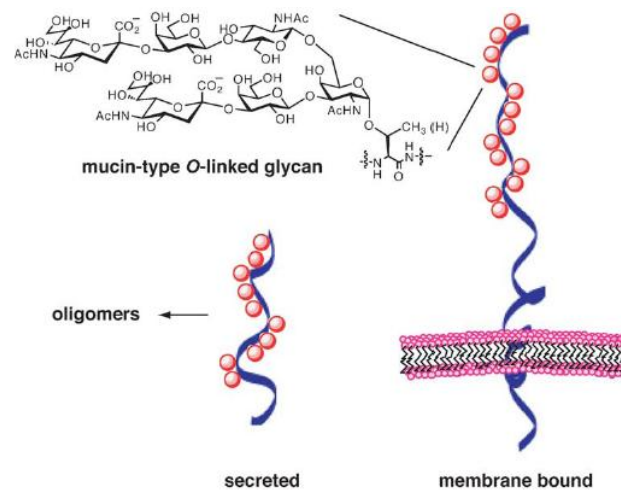


Figura 1.2.3-1: O-glicosilación tipo mucina. Arquitectura de mucinas como proteína de membrana y mucinas secretadas. Las cintas azules representan el esqueleto proteico, y las esferas rojas representan los O-glicanos. (Tomada de Hang and Bertozzi, 2005)

Las mucinas, como ya se mencionó, se caracterizan por la presencia de regiones con secuencias peptídicas repetidas, conocidas como “variable number of tandem repeat” (VNTR), las cuales son ricas en residuos de serina y treonina para ser glicosilados, además de residuos de prolina, los cuales facilitan la glicosilación. Estas regiones son altamente O-glicosiladas y el péptido obtiene una conformación de cepillo (“bottle brush”). Poseen además regiones ricas en cisteínas en ambos finales de cada molécula, que son las responsables de la polimerización debido a la formación de enlaces disulfuro, y dominios D, los cuales también son responsables de la polimerización (Figura 1.2.3-2) (Brockhausen et al., 2009).

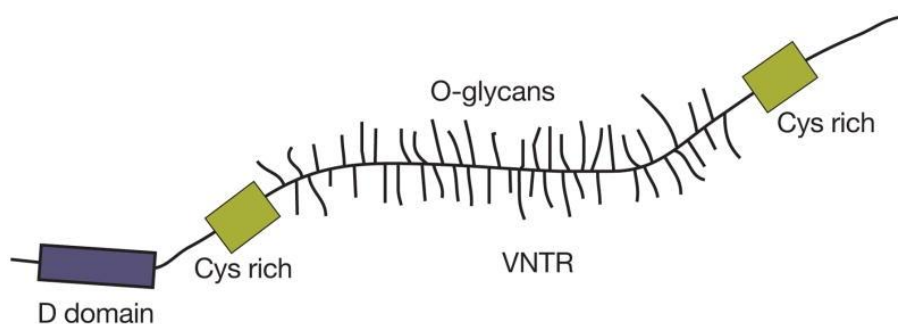


Figura 1.2.3-2: Un modelo simplificado de una mucina secretada. Se puede observar la región VNTR con su conformación cepillo de botella, además de las regiones ricas en cisteína y los dominios D. (Tomada de Brockhausen et al., 2009).

Los enlaces tipo mucina ($\text{GalNAc}\alpha 1\text{-O-Ser/Thr}$) son iniciados por una familia de glicosiltransferasas llamadas UDP-N-acetilgalactosamina:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa (ppGalNAcTs). Estas enzimas transfieren GalNAc desde el azúcar dador (UDP-GalNAc) a los residuos de serina o treonina. Debido a que el proceso de O-glicosilación se da paso a paso (Strous, 1979), la adición de los GalNAc a los residuos de serina o treonina representa el primer compromiso en la biosíntesis de mucinas (Ten Hagen et al., 2003). La estructura más simple, producto de la reacción $\alpha\text{-GalNAc-Ser/Thr}$, está compuesta por un solo residuo de N-acetilgalactosamina unido a una serina o treonina y es conocida como Antígeno Tn. Esto no se pone en evidencia comúnmente en las mucinas normales, pero sí por generalmente en mucinas derivadas de tumores (Figura 1.2.3-3) (Pratt et al., 2004; Brockhausen et al., 2009).

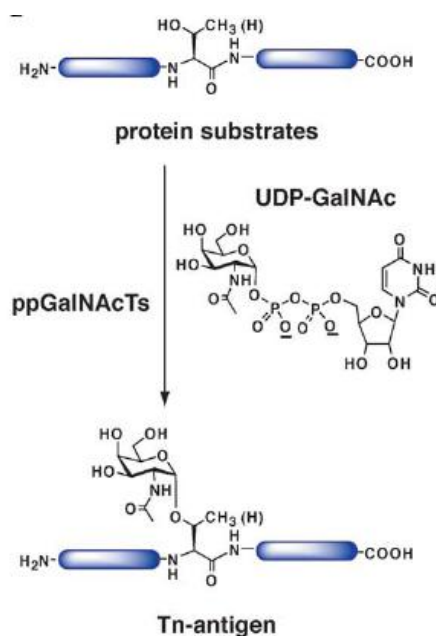


Figura 1.2.3-3: Iniciación de la O-glicosilación de mucinas por las ppGalNAc-Ts, formando en antígeno Tn. (Tomada de Hang and Bertozzi, 2005)

1.2.4 ppGalNAc-Transferasas

Todas las ppGalNAc-Ts unen el UDP-GalNAc, pero por lo general difieren en la proteína sustrato a la cual le transfieren el N-acetilgalactosamina. Estas diferencias son las que permiten que estas enzimas sean distinguidas unas de otras. Muchas de estas enzimas transfieren N-acetilgalactosamina a una treonina y no a una serina, por

ejemplo. Además parecen estar muy relacionadas unas con otras ya que algunas solamente glicosilan cuando una serina o treonina de la molécula ya está glicosilada por otra ppGalNAc-transferasa (Brockhausen et al., 2009).

Al contrario a la *N*-glicosilación que sí necesita de una secuencia específica de aminoácidos, estas enzimas tienen una especificidad de sustratos diferentes y actúan de una forma coordinada y secuencial. Las ppGalNAc-Ts sintetizan primero el antígeno Tn, cuya expresión se da solamente con la falta de la correspondiente extensión de las cadenas de *O*-glicanos, la cual puede depender de las reacciones catalizadas por las subsecuentes glicosiltransferasas. La *O*-glicosilación y por tanto la biosíntesis del antígeno Tn es un proceso complejo que está regulado por una serie de factores: la disponibilidad de ppGalNAc-Ts, ya que algunas de ellas muestran selectividad por determinado sitio y son expresadas de una manera órgano-específica; las secuencias de ciertos aminoácidos y el estado de glicosilación alrededor del potencial sitio de glicosilación que puede tanto promover como prevenir la unión de las transferasas; las modificaciones postraduccionales del péptido sustrato incluyendo la sustitución inicial del GalNAc y la glicosilación en sitios preferidos, que pueden influenciar la calidad de los sustratos próximos a los residuos de serina y treonina; y las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas entrando al aparato de Golgi, que pueden provocar que los sitios blancos sean inaccesibles (Freire and Osinaga, 2003).

Como ya se mencionó, no hay secuencias de aminoácidos específicas que se asocien con la transferencia de *N*-acetilgalactosamina, pero sí ciertos aminoácidos son preferidos en el sustrato. Los residuos de prolina cerca de los sitios de transferencia de *N*-acetilgalactosamina son en general favorables para la *O*-glicosilación de mucinas, mientras que los aminoácidos cargados pueden interferir en la actividad de las ppGalNAc-Ts. Es posible que la acción de la prolina se deba a que expone los residuos de serina o treonina por una conformación β -turn, permitiendo así una más eficiente *O*-glicosilación (Brockhausen et al., 2009).

Las ppGalNAc-Ts se caracterizan por poseer una cola N-terminal citosólica, un dominio transmembrana de tipo II, una región variable, un dominio catalítico (GT1), un dominio de reconocimiento Gal/GalNAc y un dominio tipo lectina (Hang and Bertozzi, 2005). Este dominio tipo lectina se encuentra en la cola carboxilo terminal y se utiliza

para la unión de los residuos de *N*-acetilgalactosamina que ya han sido agregados a la glicoproteína (Brockhausen et al., 2009).

La primera evidencia de la existencia de distintas isoformas de estas enzimas fue cuando en 1982 se purificó una ppGalNAc-transferasa de un hepatoma con una masa molecular de aproximadamente 55.000 Da. y luego en 1986 purificaciones de un linfoma murino mostraron una masa molecular de 70.000 Da. Esto demostró que existen diferentes isoformas y que probablemente se encuentren en tejidos diferentes. Las diferencias en las actividades también demostraron esto mismo. El clonado molecular ha permitido por lo tanto demostrar que hay 24 genes de ppGalNAc-Ts en humanos (Ten Hagen et al., 2003). De estas 24 se han encontrado ortólogos en eucariotas superiores, demostrando de esta forma un 90-98% de homología en secuencia entre especies (Hang and Bertozzi, 2005).

Los genes de las ppGalNAc-Ts tienen un número variable de exones codificantes, y una organización cromosómica dispersa. Análisis de los límites intrón/exón sugieren que la familia de las ppGalNAc-Ts surgieron por duplicación de genes con una previa divergencia (Hang and Bertozzi, 2005).

Cada isoforma tiene una distribución discreta en los tejidos adultos al igual que una regulación espacial y temporal durante el desarrollo. Algunas de estas isoformas se encuentran en un amplio rango de tejidos y actúan sobre un gran repertorio de sustratos (ppGalNAc -T1 y -T2), mientras otras están más restringidas tanto en expresión como en la preferencia por el sustrato (ppGalNAc -T5 -T7 -T10 -T11 -T12). (Ten Hagen et al., 2003; Pratt et al., 2004).

ppGalNAc-T1 y -T2 se expresan desde baja hasta moderadamente en todos los órganos humanos examinados, incluyendo corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón, y páncreas (Sutherlin et al., 1997). La similitud de estas 2 enzimas es de un 44% diferenciándose en la secuencia amino terminal, pero teniendo una importante similitud en el área central de los dominios catalíticos (White et al., 1995). ppGalNAc-T4 se ha detectado en una variedad de tejidos humanos normales, pero en niveles diferentes, pero la expresión parece estar más restringida que para T1 y T2 ya que se expresa más en intestino delgado y estómago (Bennett et al., 1998; Brooks et al., 2007). La expresión de ppGalNAc-T3 se observa principalmente epitelios glandulares como páncreas, testículos, riñón, próstata, ovario, bazo, intestino

y colón (Bennett et al., 1996; Sutherlin et al., 1997; Inoue et al., 2007). La ppGalNAc-T6 presenta una similitud de secuencia con ppGalNAc-T3 en la región codificante, además de presentar un aceptor sustrato con especificidad similar, por lo tanto una actividad similar. Se expresa en placenta y tráquea principalmente, con señales débiles en cerebro y páncreas (Bennett et al., 1999b).

Algunos miembros de la familia aparentan tener una preferencia para glicosilar polipéptidos desnudos, mientras que otros requieren una glicosilación anterior del péptido antes de que pueda actuar, sugiriendo de esta forma la complejidad y sutilidad de la regulación de la iniciación de la *O*-glicosilación (Brooks et al., 2007). Tanto ppGalNAc-T7 como ppGalNAc-T4 necesitan de este mecanismo. Para que ppGalNAc-T7 pueda glicosilar, necesita la previa glicosilación por ppGalNAc-T1. ppGalNAc-T7 presenta un patrón de expresión general en todos los tejidos, aunque se encuentra mayor expresión en la médula espinal y la tráquea (Bennett et al., 1999a; Ten Hagen et al., 2001).

ppGalNAc-T9 y ppGalNAc-T13 se expresan exclusivamente en el cerebro, aunque de ppGalNAc-T9 se ha encontrado un transcripto menor que se expresa en el corazón, hígado y músculo esquelético. La mayor expresión dentro del cerebro es en el cerebelo, mientras que en la corteza cerebral, el lóbulo frontal, lóbulo temporal y el putamen su expresión es menor (Toba et al., 2000). Sin embargo ppGalNAc-T13 se expresa altamente y restrictivamente en el cerebro y solamente presenta un nivel muy bajo o indetectable en otros tejidos. En secuencia aminoacídica es homóloga a ppGalNAc-T1, presentando un 84,3% de homología (Zhang et al., 2003).

Por otro lado, niveles importantes de expresión de ppGalNAc-T10 se encontraron principalmente en el intestino delgado, páncreas, ovario, glándula tiroidea, colon y testículos, mientras que niveles un poco menores se encontraron en corazón, cerebro, bazo, pulmón, estómago, cérvix y útero (Ten Hagen et al., 2001; Cheng et al., 2002). ppGalNAc-T11 en humanos posee un patrón de expresión único, limitado a los riñones (Schwientek et al., 2002). También se observa una alta expresión de ppGalNAc-T14 en los riñones, aunque también se observa una expresión en todos los tejidos humanos. Posee un 49,9% de homología en secuencia de aminoácidos con ppGalNAc-T2 (Wang et al., 2003). ppGalNAc-T12 se expresa principalmente en el tracto gastrointestinal y el páncreas, moderadamente en los testículos, glándula tiroidea y bazo, y débilmente en

otros tejidos. En comparación con otras isoformas, ppGalNAc-T12 es más específica en los órganos digestivos, sugiriendo que los sustratos potenciales de este subtipo, son proteínas mucinas que se secreten principalmente en estos órganos digestivos (Guo et al., 2002; Guo et al., 2004). ppGalNAc-T15 se expresa en casi todos los tejidos, aunque en diferentes niveles. Altos niveles se encuentran en el intestino delgado, placenta, bazo, corteza cerebral, y ovario, mientras niveles intermedios se observan en útero, glándula mamaria, estómago, cerebelo, y todo el cerebro (Cheng et al., 2004).

ppGalNAc-T5 ha sido clonada y caracterizada en rata, pero no se ha logrado caracterizar un ortólogo en humanos (Brooks et al., 2007), y ppGalNAc-T8 se expresa ampliamente, pero no se ha demostrado que sea funcional (White et al., 2000).

1.3 Glicosilación y Cáncer

La transformación maligna está asociada con la glicosilación anormal, resultando en la expresión de carbohidratos alterados (Kannagi et al., 2004).

El desarrollo embrionario y la activación celular en vertebrados están típicamente acompañados de cambios en los perfiles de la glicosilación celular. Por lo tanto, no es sorprendente que los cambios en la glicosilación son también una rasgo universal en la transformación maligna y la progresión tumoral (Varki et al., 2009).

Los glicanos anormales expresados por las células cancerígenas tienen una importancia funcional en la adhesión celular, en la invasión y en la metástasis (Baldus et al., 2004).

El cambio de glicanos en las células malignas puede tomar una variedad de formas. Ejemplos de esto pueden ser, la pérdida de expresión, o la expresión excesiva de ciertas estructuras, la persistencia de estructuras incompletas o truncadas, la acumulación de precursores, y no tan comúnmente la aparición de estructuras nuevas. Es interesante la observación que de todos los posibles cambios biosintéticos de los glicanos, sólo un pequeño subconjunto de los mismos son los que se correlacionan frecuentemente con la transformación maligna y la progresión tumoral. Dado que el cáncer es un proceso microevolutivo en donde sólo las células más aptas en una población heterogénea genéticamente sobreviven, es razonable sugerir que estos

cambios específicos de los glicanos son seleccionados durante la progresión tumoral. Dentro de estos cambios se pueden considerar a los siguientes: ramificación alterada de los *N*-glicanos; expresión y glicosilación alterada de las mucinas; cambios en la expresión del ácido siálico durante la malignidad; “síntesis incompleta” y expresión alterada de las estructuras de los grupos sanguíneos relacionados; regulación de la transcripción de la expresión de glicanos alterados en células malignas; expresión alterada y derramamiento de glicoesfingolípidos; pérdida de la expresión del ancla de los glicoesfingolípidos; cambios en la expresión de poli-*N*-acetilactosamina y la función galectina; cambios en el ácido hialurónico; y cambios en glicosaminoglicanos sulfatados (Varki et al., 2009).

1.3.1 Alteración en la expresión y glicosilación de mucinas

En epitelios polarizados normales, las mucinas se expresan exclusivamente en el dominio apical hacia el lumen de un órgano hueco. De la misma forma, las mucinas solubles son secretadas exclusivamente en el lumen. Sin embargo, la pérdida de la topología correcta en las células epiteliales malignas (Figura 1.3.1-1) permite que las mucinas se expresen en todos los aspectos de la célula, y que las mucinas solubles puedan entrar al espacio extracelular y a los fluidos corporales, como por ejemplo al plasma sanguíneo. La expresión simultánea de las 2 formas de mucinas durante la carcinogénesis lleva a una discusión de los papeles fisiopatológicos, ya que las 2 formas de éstas pueden tener efectos opuestos. La estructura y carga negativa de las mucinas podría repeler interacciones intercelulares y prevenir la adhesión de otras moléculas como las cadherinas e integrinas, impidiendo de esta forma que ejerzan su función. Las mucinas también bloquean físicamente las interacciones entre las células cancerígenas en la sangre y las células citolíticas como las asesinas naturales (NK). Además, las mucinas enmascaran la presentación de los péptidos antígenicos por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Varki et al., 2009).

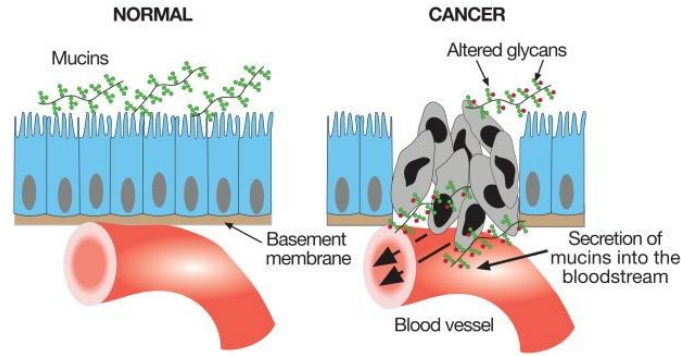


Figura 1.3.1-1: Epitelio polarizado normal y pérdida de la topología correcta en las células epiteliales malignas. (Tomada de Varki et al., 2009)

Otra característica frecuente de los carcinomas es la glicosilación incompleta. Una consecuencia común con los *O*-glicanos es la expresión del antígeno Tn (GalNAc- α 1-*O*-Ser/Thr) o T (Gal β 1-3GalNAc- α 1-*O*-Ser/Thr) (Figura 1.3.1-2). Existe una correlación entre la expresión de los antígenos Tn y T, la expresión espontánea de anticuerpos dirigidos contra ellos y el pronóstico de pacientes con carcinomas (Varki et al., 2009).

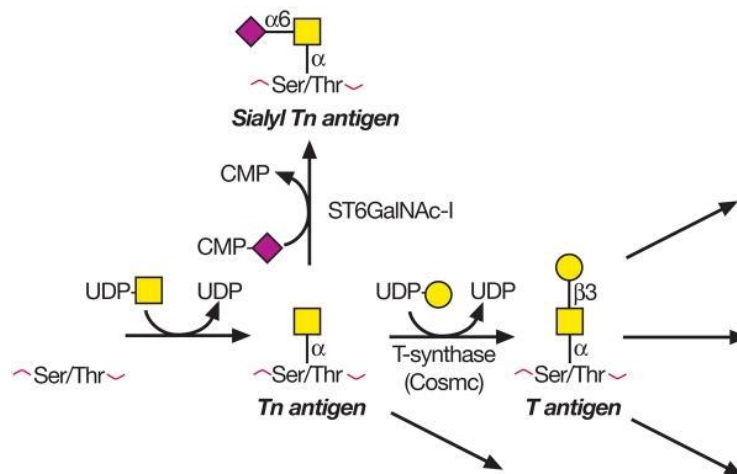


Figura 1.3.1-2: O-glicosilaciones incompletas, resultando en la expresión del antígeno Tn, el antígeno Tn siálico, o el antígeno T. Las flechas indican las vías biosintéticas siguientes. (Tomada de Varki et al., 2009)

Luego de la formación del antígeno Tn, la adición de azúcares al GalNAc que está unido a la proteína compone la región “core” o núcleo. Hasta la fecha se conocen 8 núcleos diferentes. Todos estos se basan en el núcleo- α -GalNAc que luego puede ser sustituido en el C3, C6 o en ambas posiciones con diferentes monosacáridos. Algunas

de estas estructuras están asociadas con carcinomas (Figura 1.3.1-3)(Freire and Osinaga, 2003).

Hay diferentes razones por las cuales el antígeno Tn ha tenido tanto interés en la biología del cáncer: a) puede ser un marcador de diagnóstico muy útil, ya que raramente se expresa en tejidos normales, pero sí se expresa en una gran variedad de adenocarcinomas; b) se ha encontrado una correlación entre la agresividad del carcinoma y la densidad del antígeno; c) el antígeno Tn puede ser reconocido por el sistema inmune como un nuevo epítipo y por lo tanto proporciona un blanco terapéutico importante; d) el antígeno Tn ha sido implicado también en metástasis organotrópicas de células tumorales (Babino et al., 2000).

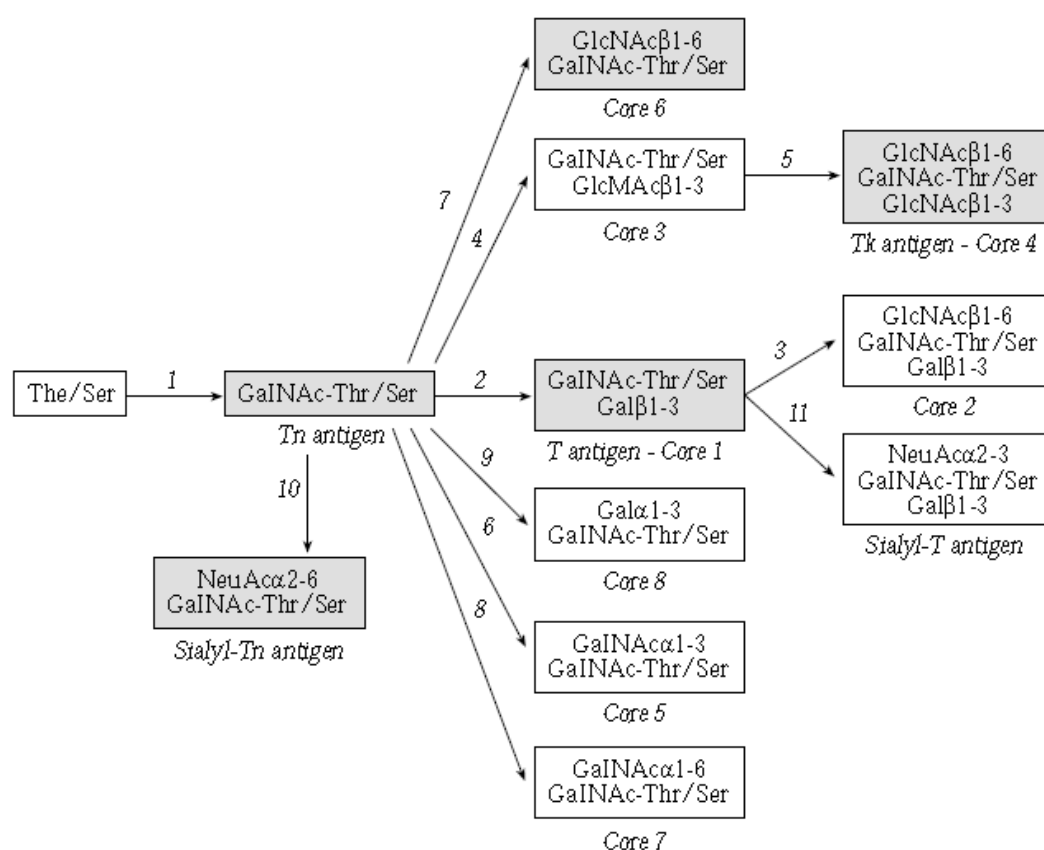


Figura 1.3.1-3: Estructuras (cores) O-glicosiladas. El primer paso es la adición de GalNAc a una Ser/Thr de la cadena polipeptídica por la ppGalNAc-T (1). Ocho núcleos de O-glicanos se pueden formar por diferentes glicosiltransferasas (2 al 9). Conversión por sialilación de antígeno Tn y T (10 y 11), resulta en un bloqueo de la elongación de O-glicanos. Las estructuras asociadas con cáncer están subrayadas en gris. (Tomada de Freire and Osinaga, 2003)

1.3.2 Alteración de las ppGalNAc-Transferasas

La expresión alterada de las ppGalNAc-Ts puede ser uno de los mecanismos que explican los cambios en las O-glicosilación de mucinas durante la transformación maligna (Hanisch et al., 2001). Variaciones en el patrón de expresión de las ppGalNAc-Ts se describieron en carcinoma oral de células escamosas, en donde una disminución de ppGalNAc-T1, ppGalNAc-T2 y ppGalNAc-T3 fue reportada en comparación con el patrón de expresión en la mucosa oral normal (Mandel et al., 1999). Niveles de expresión de ppGalNAc-T1, ppGalNAc-T2 y ppGalNAc-T3 fueron descritos en carcinoma colorrectal en comparación con niveles normales de epitelio del colon (Kohsaki et al., 2000). Diferentes niveles de expresión de ppGalNAc-T3 se detectaron en pacientes con cáncer colorrectal (Shibao et al., 2002), de pulmón (Gu et al., 2004), pancreático (Yamamoto et al., 2004), gástrico (Onitsuka et al., 2003; Ishikawa et al., 2004), de la vesícula biliar (Miyahara et al., 2004), de próstata (Landers et al., 2005), y de conducto biliar extrahepático (Inoue et al., 2007), y se ha identificado como un factor de pronóstico independiente. Nuestro grupo de investigación comunicó por primera vez que ppGalNAc-T6, se expresa en la mayoría de los cánceres de mama, y esto puede tener connotación pronóstica y utilidad como marcador de diseminación tumoral oculta en pacientes con cáncer de mama (Berois et al., 2006b; Freire et al., 2006). Se han encontrado niveles alterados también en cáncer gástrico, donde además se asoció con invasión vascular (Gomes et al., 2009). Estos resultados fueron validados por otros grupos en estudios de líneas celulares malignas de mama (Brooks et al., 2007). La expresión de ppGalNAc-T12 es un marcador negativo especialmente de cáncer gástrico y colorrectal metastásico. Ésta se expresa en el tejido normal, pero no se expresa en tejidos cancerosos (Guo et al., 2004). Por otro lado ppGalNAc-T13 se ha demostrado que es un marcador de agresividad en neuroblastoma, con potencial utilidad para mejorar la estadificación en pacientes con estos tumores (Berois et al., 2006a).

2. Objetivos

El principal objetivo de este estudio es buscar nuevos marcadores moleculares de potencial interés oncológico utilizando modelos de cáncer de pulmón y neuroblastoma.

2.1 Objetivos generales

Estudios previos han demostrado la expresión diferencial de las ppGalNAc-Ts en diferentes tipos de carcinomas, lo que las convierte en potenciales marcadores moleculares en oncología.

Existen pocos datos documentados de la expresión de estas enzimas en cáncer de pulmón y en neuroblastoma, por lo que el objetivo general de este trabajo es estudiar la expresión de esta familia de enzimas en modelos celulares de ambos tumores en busca de potenciales marcadores moleculares para los mismos.

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar la expresión de los ARN mensajeros de 13 ppGalNAc-Ts en un panel de líneas celulares de pulmón y neuroblastoma, representativo de diferentes tipos histológicos y establecidas a partir de diferentes estadios tumorales.
- Caracterizar a nivel de expresión proteica las enzimas que muestren un comportamiento más interesante en el cumplimiento del objetivo anterior.

3. Materiales y métodos

3.1 Líneas celulares

Se utilizaron distintas líneas celulares tanto de cáncer de pulmón como de neuroblastoma, representativas de diferentes tipos histológicos y diferentes estadios de la enfermedad.

3.1.1 Líneas celulares de neuroblastoma

Las líneas de neuroblastoma humano fueron establecidas a partir de tumores primarios o focos secundarios, con frecuencia neuroblastos que invaden la médula ósea de niños de diferentes edades (Tabla 3.1.1-1). El modelo de neuroblastoma metastático, IGR-N-91, deriva de un neuroblastoma de alto riesgo y procede de una línea celular parental establecida a partir de neuroblastos de la médula ósea de un niño de 8 años, luego de 3 xenoinjertos en ratones desnudos. Las líneas celulares fueron establecidas a partir del tumor primario (PTX) y metástasis de médula ósea (BM) (Ferrandis et al., 1994; Blanc et al., 2003).

Tabla 3.1.1-1: Líneas celulares de Neuroblastoma.

Líneas	Derivado metastático	Edad	Estadio	Referencia
IMR-32	masa abdominal	13 meses	-	(Tumilowicz et al., 1970)
SK-N-AS	médula ósea	8 años	4	(Thiele, 1998)
SH-SY5Y	médula ósea	4 años	4	(Ciccarone et al., 1989)
SK-N-BE ₂	médula ósea	2 años	4	(Barnes et al., 1981)
LAN-1	médula ósea	2 años	4	(Seeger et al., 1977)
LAN-5	médula ósea	4 meses	4	(Thiele, 1998)
IGR-N-91	médula ósea	8 años	4	(Ferrandis and Bénard, 1993)

3.1.2 Líneas celulares de cáncer de pulmón

Las líneas de cáncer de pulmón humano corresponden a diferentes tipos histológicos de cáncer de pulmón y de diferentes estadíos del mismo, establecidos a partir del tumor primario o de focos metastáticos (Tabla 3.1.2-1).

Tabla 3.1.2-1: Líneas celulares de cáncer de pulmón.

Línea	Enfermedad	Der. Metastático	Estadío	Referencia
SK-MES-1	Carcinoma de células escamosas	derrame pleural		(Fogh et al., 1977)
A549	Carcinoma			(Giard et al., 1973)
NCI-H1703	Adenocarcinoma; NSCLC		1	(Phelps et al., 1996)
NCI-H838	Adenocarcinoma; NSCLC	nodo linfático	3B	(Phelps et al., 1996)
NCI-H1755	Adenocarcinoma; NSCLC	hígado	4	(Phelps et al., 1996)
H69AR	Carcinoma; SCLC; resistente a drogas			(Mirski et al., 1987)
NCI-H526	Carcinoma; variante de SCLC	médula osea	E	(Carney et al., 1985)
NL20	Normal; bronquios			(Schiller et al., 1994)
NCI-H1975	Adenocarcinoma; NSCLC			(Phelps et al., 1996)
NCI-H1650	Adenocarcinoma; carcinoma bronquialveolar	derrame pleural	3B	(Phelps et al., 1996)

3.2 Extracción de ARN

A partir de las líneas celulares se procede a realizar una extracción de ARN mediante el método con TRIZOL en el cual se obtiene una fase acuosa que contiene el ARN, una fase fenólica conteniendo los componentes lipídicos y una interfase en la que se encuentran las proteínas y el ADN. El procedimiento a seguir en este método se basa en la adición de 200 µL de cloroformo, vortexear e incubar a temperatura ambiente durante unos 15 minutos. Luego se centrifuga a 13.000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Se forman las 3 fases, y se recupera la fase acuosa, a la cual se le agrega igual volumen de isopropanol. Se incuba a temperatura ambiente durante 10 o 15 minutos, y se vuelve a centrifugar a 13.000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Se descarta el sobrenadante y se lava el pellet con etanol 75%. Se vuelve a centrifugar a 13.000 rpm a 4°C durante 15 minutos y se vuelve a descartar el sobrenadante. Se seca el pellet a

56°C durante 10 minutos y se resuspende dicho pellet en agua destilada libre de RNAsas.

3.3 RT-PCR

Mediante esta técnica se podrá evaluar cuales de los ARN mensajeros de las diferentes ppGalNAc-Ts se expresan en las distintas líneas de pulmón y de neuroblastoma.

3.3.1 Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 1 µg de ARN de cada línea celular en un volumen final de 20 µL, conteniendo 4 µL de buffer 5X, 2 µL de DTT, 2 µL de dNTP, 1 µL de RH, 1 µL de transcriptasa reversa (M-MLV RT), durante 55 minutos a 37°, neutralizando la enzima a 85° durante 5 minutos.

3.3.2 Amplificaciones por PCR

Para comprobar la calidad de la síntesis de cDNA se amplifica el gen de β 2-microglobulin, para el cual se utilizan 0.5 µL de cada uno de los primers β 2M-S y β 2M-AS en una concentración de 20 µM (Tabla 3.3.2-1), 1 µL de cDNA, 17,5 µL de H₂O, 2,5 µL de Buffer 10X, 2 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,5 µL de dNTP y 0,5 µL de Taq, en un volumen total de 25 µL. La amplificación se realiza por 35 ciclos de 45 segundos a 95°, 1 minuto a 60° y 1 minuto a 72°.

Si la calidad del cDNA es buena, se procede a realizar la amplificación de los genes de las distintas ppGalNAc-Ts. Para esto se prepara también un volumen de reacción total de 25 µL, conteniendo 2,5 µL de de buffer 10X, 2 µL de MgCl₂ 25 mM (excepto para ppGalNAc-T13 que se utilizan 3 µL), 0,5 µL de cada uno de los primers utilizados para cada una de las ppGalNAc-Ts (Tabla 3.3.2-1), 0,5 µL de dNTP, 0,5 µL de Taq y 1 µL de cDNA de la línea correspondiente. El programa de amplificación utilizado para todas las ppGalNAc-Ts, (menos para la ppGalNAc-T9) se basa en 35 ciclos de 30 segundos a 94°, 30 segundos a la temperatura de hibridación, y 1 minuto a 72°. La temperatura de hibridación varía entre las ppGalNAc-Ts, para ppGalNAc-T1, -T2, -T4, -T6, -T7, y -T15 es

de 60°, mientras que para ppGalNAc-T3, -T11, -T12, y -T14 es de 56°, y para ppGalNAc-T10 es de 62°. Por otro lado el programa utilizado para ppGalNAc-T9 se basa en 40 ciclos de 30 segundos a 94°, 30 segundos a 60°, y 1 minuto a 72°.

La visualización del producto amplificado se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio documentando el resultado mediante fotografía bajo luz ultravioleta.

Tabla 3.3.2-1: Secuencias de primers utilizados para cada una de las RT-PCRs.

Enzima	Número acceso	Secuencia 5' - 3'	Tamaño producto PCR
ppGalNAc-T1	X85018	AAAAGCCTCATGAAGTCCTGG ATCCAGAACGTTGTTCCATTCG	410 bp
ppGalNAc-T2	X85019	CCGCAACAAGTTCAACCAGGTG GCATGAGGCCTTCTCGTCGATC	316 bp
ppGalNAc-T3	X92689	GGGAAGCTAAACTGCTTT TCCTAGCAACCGAGCAGTGATC	362 bp
ppGalNAc-T4	Y08564	ATGGCGGTGAGGTGGAATTG GGAGCAAAGTCGACCAGGCTTC	457 bp
ppGalNAc-T6	Y08565	TCCAAATCAGGGCTCCAGAAG CACCTGCAGCTGCTTCACGTAC	499 bp
ppGalNAc-T7	AJ002744	AGCACCATGCTGGAGGAGATTC CTTCACTAGGCCATTCCACAGC	524 bp
ppGalNAc-T9	AB040672	TACCGGCCAGAAAAGTGACAG ACCGCTTGTTGACGTACTGGTC	223 bp
ppGalNAc-T10	AB078145	GAATACCGCCACCTCTCCGCTG GTCTTGCTTTGCGGTATTTCC	431 bp
ppGalNAc-T11	Y12434	GACCTGAAGACGAAAAGCTATG TTCCCAAAGGTCCACTGCTGGG	440 bp
ppGalNAc-T12	AB078146	CCCCCGTGCCGCTTGAACC ATAAAGATCCATCCTCCTGCAAG	422 bp
ppGalNAc-T13	AB078142	ACATCTATCCGGAATCCC TCATGTGCCAAGGTCATGTTCC	425 bp
ppGalNAc-T14	AB078144	GTATCTGAATGCCAAAAGTGG GGCAACTTGATGAGCTGTTAC	318 bp
ppGalNAc-T15	AB078149	CTCCTTGAGCAAGGCTGAGAAG GGATGGCCAGGCCTTCTCCG	368 bp
β2-microglobulin	AB021288	ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAG AAGTTGCCAGCCCTCCTAGAGC	600 bp

Ante la constatación de la existencia de variantes de splicing de ppGalNAc-T13, se optimizaron RT-PCRs específicas de las mismas utilizando primers cuya secuencia se presenta en la tabla 3.3.2-2.

Tabla 3.3.2-2: Secuencias de primers utilizados para cada las RT-PCRs de las variantes de ppGalNAc-T13

Primers	Secuencia 5' - 3'	Tamaño producto PCR
T13_XhoI_Fw	ATGAGGAGATTTGTCTACTGC	332 o 163(Δ 2) bp
T13_140_Rev	GGGTAGACTTTTGTCTTACATCCC	
T13_784_Fw	CTGAATTTCCGCTGGTATCC	370 o 280(Δ 6) bp
T13_Ex7_R	GGGATATGATGTAGAAGAAATC	
T13_Ex7_F	CAATGTGGAGGCTCCTTG	622 o 532(Δ 9) bp
T13_11_R	TAGGCACCATTTTGTCTTCTT	

3.4 Western Blot

3.4.1 Preparación de extractos celulares

La preparación de los extractos celulares se realizó mediante la incubación de las células durante 30 minutos con el buffer de lisis (ver anexo I), continuado por una sonicación y una centrifugación a 4600 rpm durante 10 minutos y guardando el sobrenadante de dicha centrifugación. Para conocer la concentración de dichas proteínas se realiza una dosificación de éstas por el método de BCA, ácido bicinconínico mediante el cual se siembran 10 μ L de las diluciones de BSA y diluciones de nuestra muestra. A esto se le agregan 200 μ l de BCA-CuSO₄ (en relación 50/1), se incuba a 37° durante 30 minutos y luego se leyó su absorbancia a 570 nm.

3.4.2 Western Blot

Entre 10 y 50 μ g del extracto proteico fue resuelto por SDS-PAGE. Para esto se necesitan preparar 2 soluciones diferentes, una correspondiente al gel separador (12% acrilamida) y otra para el gel de stacking (5% acrilamida).

Luego de la corrida del gel se procede a realizar la transferencia semi-seca, mediante la cual se transfieren las proteínas a 20V durante aproximadamente 40 minutos.

Luego de la transferencia se bloquea la membrana, mediante una solución (BSA 3% en PBS) durante toda la noche a 4°C y a continuación se realizan 3 lavados (PBS 1X-tween) de 10 minutos cada uno.

La incubación de las membranas con el anticuerpo primario (sobrenadante de cultivo de hibridomas puro) se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se vuelven a realizar lavados de 10 minutos cada uno y se pasa a incubar la membrana con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente, protegiéndolo de la luz para preservar la actividad. Se utilizaron diferentes diluciones del anticuerpo. Se realizan 5 lavados de 10 minutos cada uno.

Se incuba la membrana con el kit de revelado (solución de peróxido) durante 1 minuto protegiéndolo de la luz también, luego se realiza la exposición de la placa en la cual durante los primeros 5 minutos se produce el pico de señal, por lo que se debe exponer rápidamente.

3.5 Electroforesis Bidimensional

3.5.1 Preparación de extracto celular

El primer paso a realizar es retirar el medio de cultivo, lavar con PBS 1X y agregarle un volumen adecuado de tripsina durante 3 minutos a 37°C. La tripsina luego se neutraliza con medio de cultivo, y centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos. El pellet se resuspende en PBS 1X, y se vuelve a centrifugar. Se realiza otro lavado con PBS 1X y se resuspende en el volumen adecuado de buffer de lisis conteniendo inhibidores de proteasas (ver anexo I) e incubando a temperatura ambiente en agitación durante 30 minutos. Se cuantifican las proteínas totales en la muestra mediante Bradford (5 µl de extracto en 150 µl de reactivo de Bradford, lectura a 595 nm).

3.5.2 Primera dimensión: Isoelectroenfoque

Entre 90 y 150 µg de proteínas fueron enfocadas isoelectricamente sobre gradientes de pH de 3 a 10 en strips de 7 cm. Para determinar el volumen de muestra a usar, se considera que para los geles que serán teñidos con plata, es necesario sembrar 100-150 µg de proteína, mientras que para los geles que serán usados para Western Blot, se siembran 90 µg de proteína.

3.5.3 Segunda dimensión: SDS-PAGE

La separación por SDS-PAGE se realizó en geles de poliacrilamida 12%. Se colocan las tiras anteriormente utilizadas sobre el gel y se funde la solución sellante de agarosa. Se corren los geles a 50 mA por gel, con un voltaje máximo de 150V, durante aproximadamente 2 horas o hasta que el frente de corrida llegue a 0,5 cm del final del gel.

Se retiran los geles y se transfieren las proteínas de uno de ellos a una membrana de nitrocelulosa. El otro gel, que será empleado para tinción de proteínas con nitrato de plata se deja overnight en solución de fijación (ver anexo I).

3.5.4 Tinción con nitrato de plata

Luego de pasar la noche en solución de fijación, se realizan 3 lavados con la solución de lavado (etanol al 50%). Se enjuaga con la solución de tiosulfato ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,2g/L.) y luego con agua 3 veces. Se incuba en solución de AgNO_3 (0,2% AgNO_3 y 0,75mL/L de formaldehído al 37%) durante 20 minutos, y se vuelve a enjuagar 3 veces con agua. Se revela con la solución de revelado (ver anexo I) hasta visualizar los spots, se incuba durante 5 minutos en la solución de fijación restante y se lava con solución de lavado. Para conservar se coloca en la solución de conservación (25% etanol y 3% Glicerol).

4. Resultados

4.1 Neuroblastoma

Se observó expresión diferencial de algunas ppGalNAc-transferasas en algunas de las líneas celulares de neuroblastoma estudiadas.

Las enzimas ppGalNAc- T1, -T2, -T4, -T6, -T7, -T11 y -T14 se expresan en todas las líneas celulares estudiadas (Figura 4.1-1).

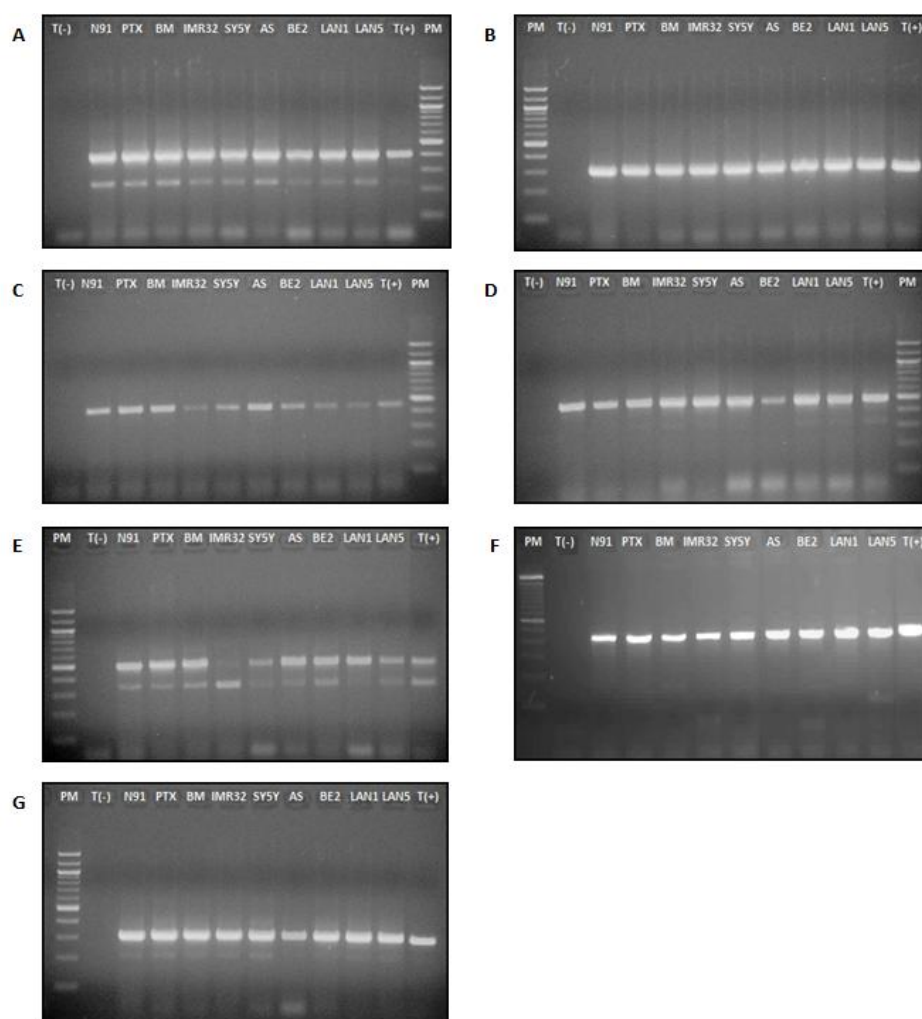


Figura 4.1-1: RT-PCR de las ppGalNAc-Ts que no presentaron expresión diferencial para cada una de las líneas celulares de Neuroblastoma, A) ppGalNAc-T1; B) ppGalNAc-T2; C) ppGalNAc-T4; D) ppGalNAc-T6; E) ppGalNAc-T7; F) ppGalNAc-T11; G) ppGalNAc-T14.

Se puede observar tanto en la figura 4.1-1A como en la figura 4.1-1E dos bandas correspondientes a diferentes pesos moleculares. Estas bandas que no corresponden a los pesos moleculares esperados podrán deberse a variantes de splicing, lo cual fue confirmado por secuenciados por la ppGalNAc-T1 (Figura 4.1-1A).

Por otro lado las ppGalNAc-T3, -T9, -T10, -T12, -T13 y -T15 presentaron una expresión diferencial, ya que se expresaron en algunas líneas celulares mientras que en otras no.

La ppGalNAc-T3 es negativa en la mayoría de las líneas celulares de neuroblastoma: solamente se observó una leve expresión en BM, en SK-N-AS y en SH-SY5Y.



Figura 4.1-2: RT-PCR para ppGalNAc-T3 en las líneas de Neuroblastoma.

De la misma forma se puede observar en la figura 4.1-3 como ppGalNAc-T9 tampoco se expresa en la mayoría de las líneas celulares, exceptuando PTX y SK-N-BE₂ en las cuales sí se observa una expresión evidente. Además se observan bandas más tenues que indicaría menor expresión en las líneas SK-N-AS y IGR-N-91.

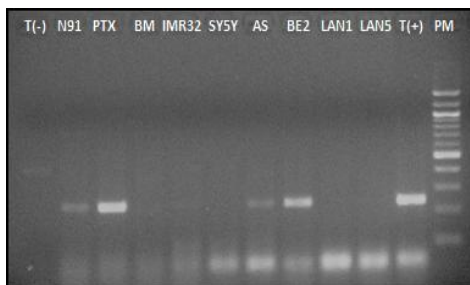


Figura 4.1-3: RT-PCR para ppGalNAc-T9 en las líneas de Neuroblastoma.

La expresión de ppGalNAc-T10 es también de baja intensidad pero está presente en la mayoría de las líneas celulares analizadas (Figura 4.1-4).

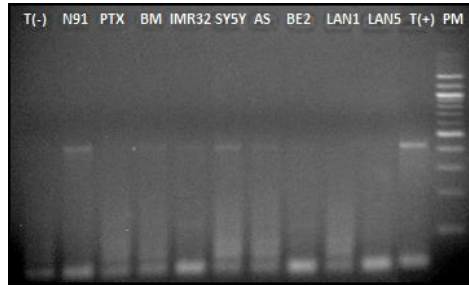


Figura 4.1-4: RT-PCR para ppGalNAc-T10 en las líneas de Neuroblastoma.

A diferencia de los resultados antes mencionados, se observa que ppGalNAc-T12, ppGalNAc-T13, y ppGalNAc-T15 se expresan en la mayoría de las líneas celulares.

La figura 4.1.5 muestra la expresión de ppGalNAc-T12 en la mayoría de las líneas celulares exceptuando en LAN5.

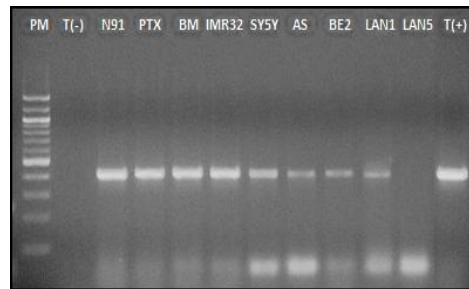


Figura 4.1-5: RT-PCR para ppGalNAc-T12 en las líneas de Neuroblastoma.

En la figura 4.1.6 se puede observar la expresión de ppGalNAc-T13 en la mayoría de las líneas celulares, excepto en IGR-N91. Se observan en el gel 2 bandas, una correspondiente a 425 pb como se esperaba y otra un poco menor, ésta corresponde a la variante de splicing con delección del exón 9 que presenta ppGalNAc-T13, identificada en nuestro laboratorio.

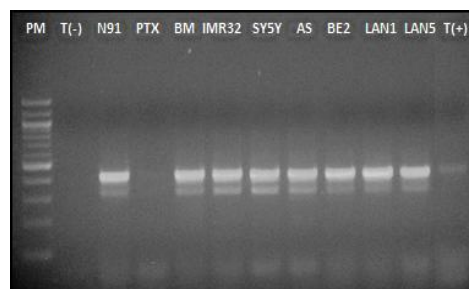


Figura 4.1-6: RT-PCR para ppGalNAc-T13 en las líneas de Neuroblastoma.

En la figura 4.1.7 se muestra la expresión de ppGalNAc-T15 en la mayoría de las líneas celulares, a excepción de BM.

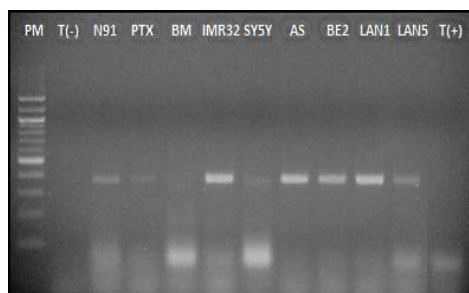


Figura 4.1-6: RT-PCR para ppGalNAc-T15, en las líneas de Neuroblastoma.

4.2 Cáncer de pulmón

4.2.1 RT-PCRs

Mediante las RT-PCRs específicas para cada una de las ppGalNAc-Ts se puede observar la expresión diferencial de algunas de estas enzimas también en las distintas líneas celulares de cáncer de pulmón. Los genes de ppGalNAc- T1, -T2, -T4, -T7, -T10, -T11 y -T12 no presentan una expresión diferencial entre las mismas (Figura 4.2.1-1).

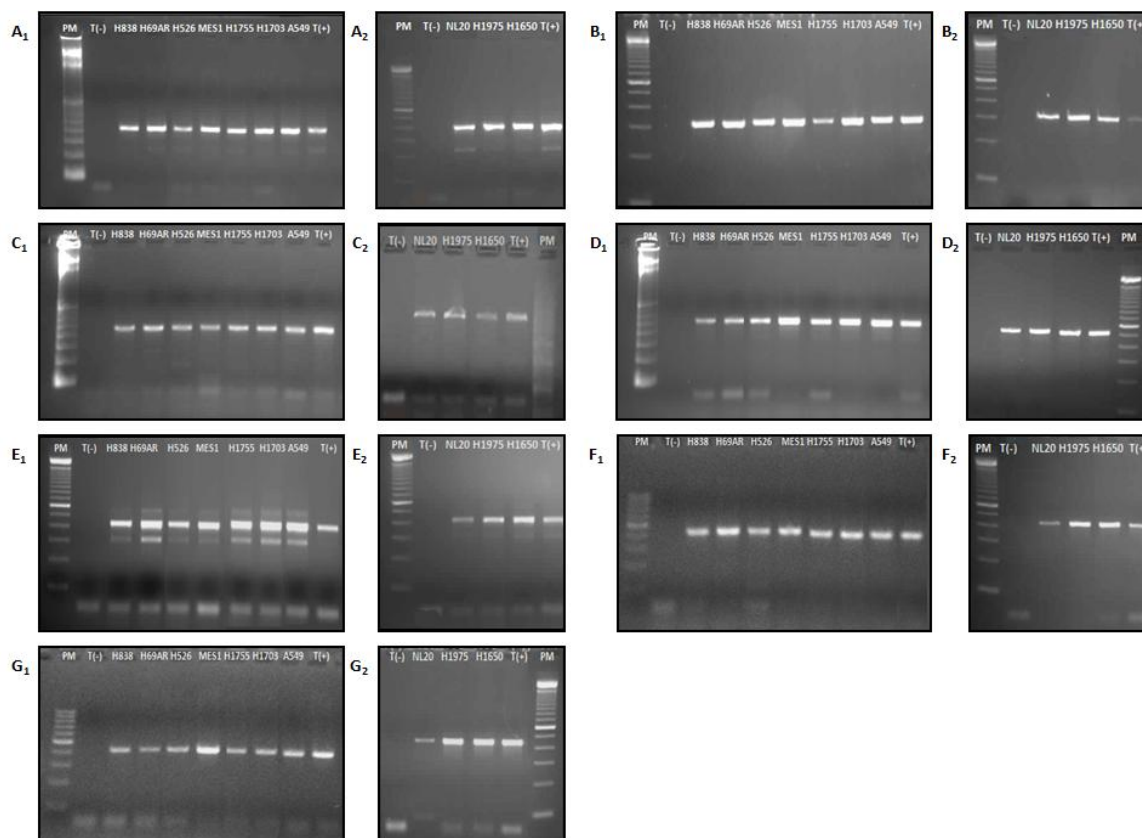


Figura 4.2.1-1: RT-PCR de las ppGalNAc-Ts que no presentaron expresión diferencial para cada una de las líneas celulares de cáncer de pulmón, A) ppGalNAc-T1; B) ppGalNAc-T2; C) ppGalNAc-T4; D) ppGalNAc-T7; E) ppGalNAc-T10; F) ppGalNAc-T11; G)ppGalNAc-T12. Se presentan 2 partes de cada imagen debido se realizó el experimentos en dos partes.

Se puede observar en la figura 4.2.1-1E que en ppGalNAc-T10 los primers utilizados amplifican más de una banda, lo cual puede deberse al igual que en los otros casos, a variantes de splicing de esta enzima, aunque este resultado no ha sido aún confirmado por secuenciación.

Por otro lado los genes de ppGalNAc-T3, -T6, -T9, -T13, -T14, y -T15 sí presentaron una expresión diferencial, ya que se expresaron en algunas líneas celulares mientras que en otras no.

Se puede observar en la figura 4.2.1-2 A y B la expresión de ppGalNAc-T3, la cual se expresa intensamente en H526, H1755, H1703, H1975 y H1650, mientras que H838, H69AR y A549 presentaron expresión leve y NL20 y SK-MES-1 fueron negativas.

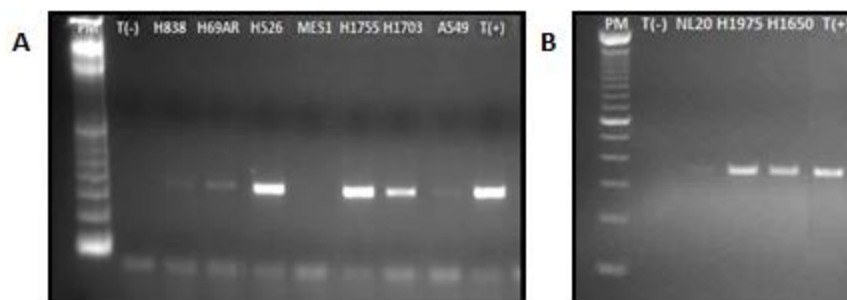


Figura 4.2.1-2: RT-PCR para ppGalNAc-T3 en las líneas de cáncer de pulmón.

En el caso de ppGalNAc-T6 (figura 4.2.1-3 A y B) se puede observar también la expresión de la misma en la mayoría de las líneas celulares, exceptuando en H69AR en la cual no se observa banda. Resulta interesante la expresión de ppGalNAc-T6 y ppGalNAc-T3 en algunas de estas líneas celulares presentan una expresión inversa: por ejemplo NCI-H1703 y NCI-H1755 expresan intensamente ppGalNAc-T3 y tenuemente ppGalNAc-T6, mientras lo inverso ocurre para H838 y A549.

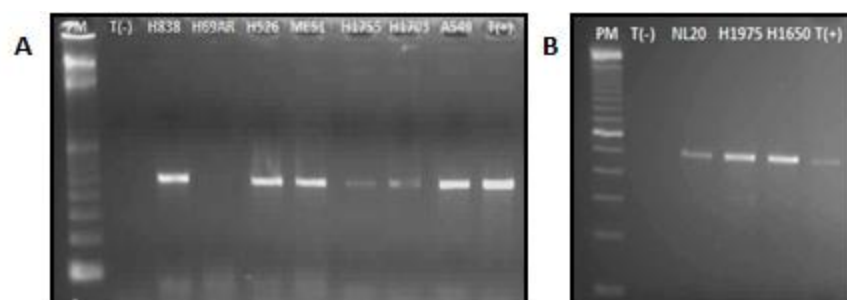


Figura 4.2.1-3: RT-PCR para ppGalNAc-T6 en las líneas de cáncer de pulmón.

También ppGalNAc-T9 se expresa en algunas líneas mientras que en otras no. SK-MES-1, A549, NCI-H1650 y NCI-H1975 son positivas mientras que las demás son negativas (Figura 4.2.1-4 A y B). En algunas de las líneas celulares se observaron bandas tenues a diferente peso molecular no esperado que inicialmente se interpretaron como posibles variantes de splicing como en otras ppGalNAc-Ts, pero se constató por secuenciación que no corresponden a ppGalNAc-T9.

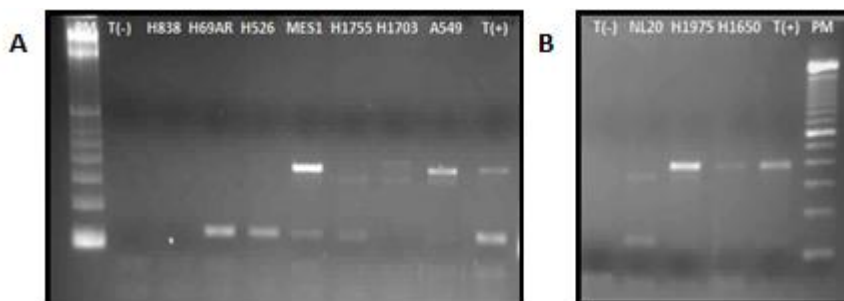


Figura 4.2.1-4: RT-PCR para ppGalNAc-T9 en las líneas de cáncer de pulmón.

En la figura 4.2.1-5 A y B se puede observar la expresión de ppGalNAc-T13 en las líneas H69AR, NCI-H526, NCI-H1703, NCI-H1755, A549 y NCI-H1650, mientras que en NCI-H838, SK-MES-1, NL20 y NCI-H1975 no se observa expresión de ésta. Se pueden observar tres bandas en algunas de las líneas celulares, que como ya se mencionó corresponden a las variantes de splicing de ppGalNAc-T13, las cuales han sido previamente estudiadas por nuestro grupo de investigación. Se distinguen 3 bandas que corresponden: a la banda superior de 425 pb a la secuencia nativa, la que se encuentra inmediatamente por debajo corresponde a la delección de los últimos 39 pb del exón 9 y la banda inferior a la delección del exón 9 completo. Tanto la enzima nativa como las variantes descritas presentan expresión diferencial en las diferentes líneas de cáncer de pulmón.

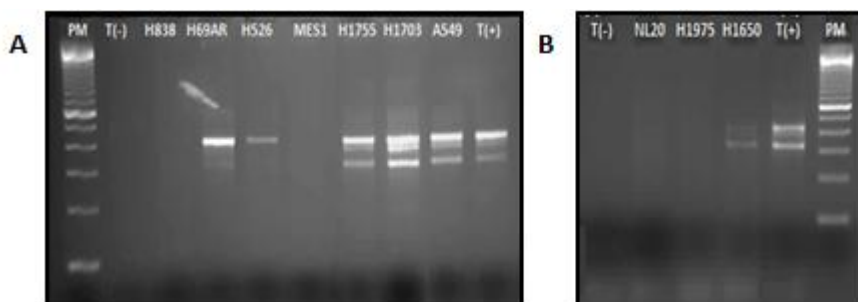


Figura 4.2.1-5: RT-PCR para ppGalNAc-T13 en las líneas de cáncer de pulmón.

Para el caso ppGalNAc-T14 y ppGalNAc-T15 se observa expresión en la mayoría de las líneas celulares. Para el caso de ppGalNAc-T14 se puede observar en la figura 4.2.1-6 A y B una expresión en todas las líneas excepto en H69AR, mientras que para ppGalNAc-T15 (figura 4.2.1-7 A y B) la única negativa es H1650. Sin embargo la expresión en NCI-H1755 y NCI-H1703 es más débil que en las otras.

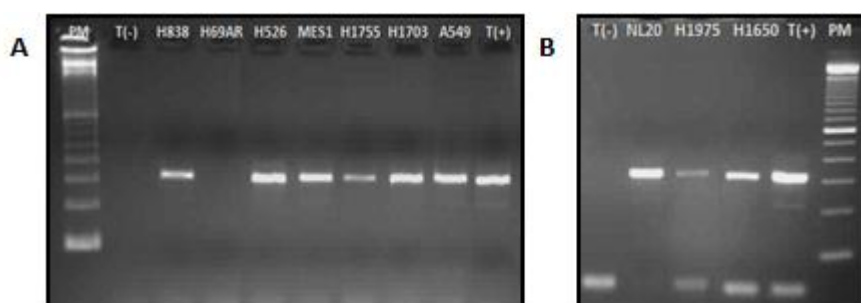


Figura 4.2.1-6: RT-PCR para ppGalNAc-T14 en las líneas de cáncer de pulmón.

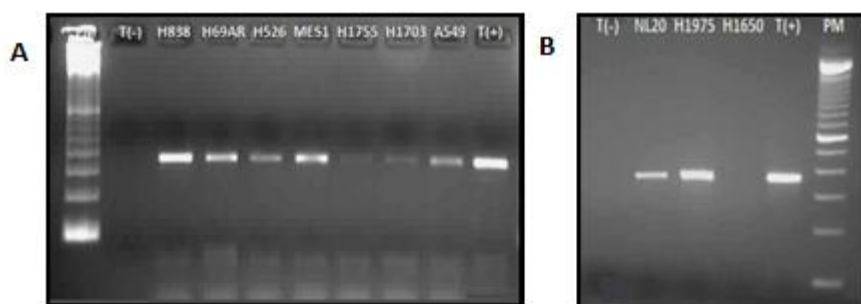


Figura 4.2.1-7: RT-PCR para ppGalNAc-T15 en las líneas de cáncer de pulmón.

En todas las PCR se utilizaron controles positivos correspondientes a otras líneas celulares de expresión conocida para cada enzima. Los controles negativos se tratan del mix preparado previamente pero sin agregarle cDNA, para controlar que los reactivos no estuvieran contaminados. Los marcadores de peso molecular en todos los casos van de 100 pb en 100 pb.

4.2.2 Western Blot

El estudio de la expresión de estas enzimas a nivel proteína en las líneas celulares se realizó mediante western blot con los anticuerpos, disponibles en nuestro laboratorio, específicos de ppGalNAc-T13.

Se procedió a realizar un Western Blot de ppGalNAc-T13 utilizando líneas positivas y negativas para la enzima a nivel del ARN mensajero.

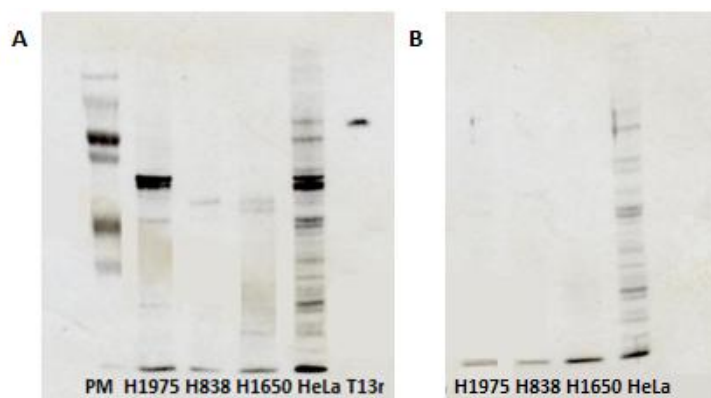


Figura 4.2.2-1: Western Blot correspondiente a ppGalNAc-T13 en algunas líneas de cáncer de pulmón. El anticuerpo primario se utilizó puro, y el secundario con una dilución fue de 1/3000. A) Western Blot utilizando anticuerpo primario T13.5, y B) control negativo, sin utilizar anticuerpo primario.

En la figura 4.2.2-1 se observa los resultados obtenidos con H1975, H838, H1650, HeLa (línea celular de cáncer de cuello en la que ya se había demostrado la expresión de ppGalNAc-T13 nativas y varias variantes de splicing) y ppGalNAc-T13 recombinante como control positivo. La banda del control positivo a la altura de peso molecular esperado se observa también en HeLa pero no en las líneas de cáncer de pulmón. En cambio se observan bandas intensas más bajas, tanto en NCI-H1975 como en HeLa, que no corresponden a reconocimiento inespecífico del anticuerpo secundario porque no se encuentran en el testigo negativo sin anticuerpo primario. Estas bandas más bajas pueden corresponder a las variantes de splicing mencionadas anteriormente. La aparente contradicción de encontrar una de estas variantes a nivel proteína mientras que el ARN mensajero fue negativo, como es el caso de NCI-H1975, puede corresponder a que los primers utilizados amplifican secuencias del dominio lectina de la enzima, donde se encuentra el mayor número de variantes. Pudo suceder que la secuencia complementaria a los primers utilizados estuviera delecionada en esta línea y que exprese variantes reconocidas por el anticuerpo cuyo epítipo se encuentra en la región stem.

Por lo tanto el siguiente paso para comprobar esta hipótesis fue realizar RT-PCR específica para algunas variantes ya identificadas en la línea de neuroblastoma BM con diferentes primers, presentados en la tabla 3.3.2-2. Estos primers reconocen las variantes con deleción del exón 2, deleción del exón 6 y deleción del exón 9.

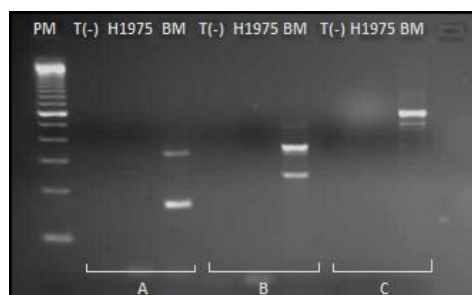


Figura 4.2.2-2: RT-PCR de ppGalNAc-T13 utilizando 3 juegos de primers diferentes en las líneas NCI-H1975 y BM. A) Primers T13_Xhol_Fw y T13_140_Rev; B) Primers T13_784_Fw y T13_Ex7_R; y C) Primers T13_Ex7_F y T13_11_R.

Sin embargo, se puede observar en la figura 4.2.2-2 que aunque la línea NCI-H1975 no expresó ninguna de estas variantes, no se descarta la posibilidad que pudiera tratarse de otras variantes diferentes a las buscadas.

4.2.3 Electroforesis bidimensional

Dado que HeLa presentó tanto la proteína nativa como algunas variantes, se intentó profundizar en el estudio de las mismas realizando electroforesis bidimensional. Los resultados se muestran en la figura 4.2.3-1.

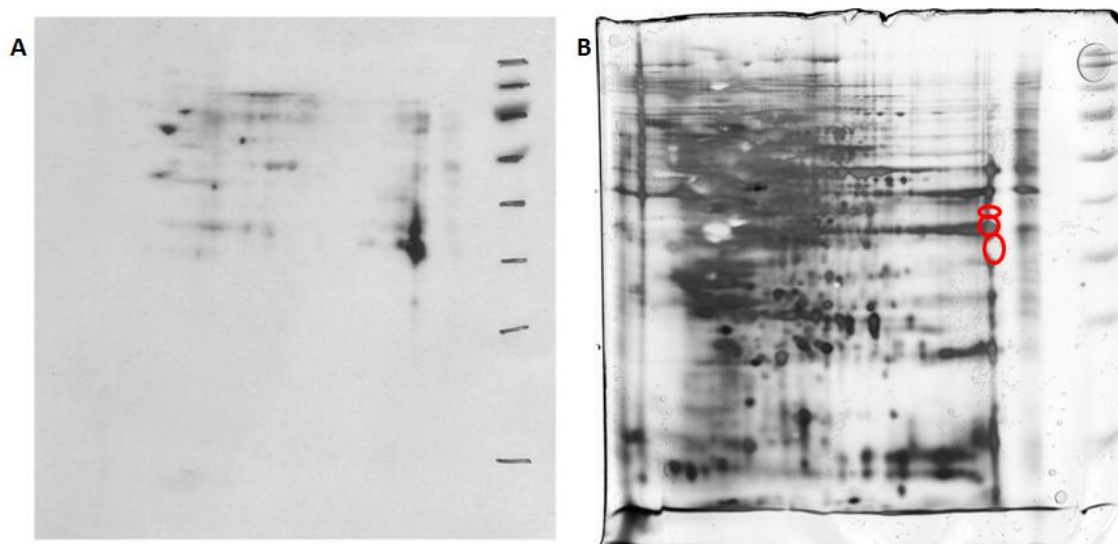


Figura 4.2.3-1: Electroforesis bidimensional de la línea celular HeLa, con anticuerpo para T13. A) Resultado del western blot, y B) gel teñido con nitrato de plata.

Al superponer el western blot con el gel teñido con nitrato de plata se pueden obtener los spots de interés y de esta forma cortarlos para poder analizar solamente

este spot. Se puede observar en la figura tres círculos en rojo que representan los spots que seleccionamos para analizar, coherentes con los hallazgos del Western blot.

Para completar la caracterización de estos spots se deberá proceder a cortar del gel los mismos y analizarlos por espectrometría de masa.

5. Discusión

Los resultados del presente estudio pretenden contribuir a la búsqueda de nuevos marcadores moleculares de cáncer, tanto para neuroblastoma como para cáncer de pulmón. La caracterización en muestras clínicas de las isoenzimas de la familia ppGalNAc-Ts que presentaron expresión diferencial en las líneas celulares en este estudio, podría conducir a la identificación de eventuales nuevos marcadores tumorales.

La alteración en la glicosilación es un rasgo característico de las células cancerígenas. Estudios previos mostraron la alteración de estas enzimas en varios tipos de tumores. Por ejemplo, se ha demostrado que la sobre-expresión de la ppGalNAc-T3 en tumores se asocia con mal pronóstico en pacientes con cáncer de vesícula (Miyahara et al., 2004) y también en cáncer de colon (Shibao et al., 2002). Nuestro grupo ha identificado a la ppGalNAc-T6 como potencial marcador en cáncer de mama (Berois et al., 2006b; Freire et al., 2006) y en cáncer gástrico (Gomes et al., 2009), donde la expresión de esta isoenzima se correlacionó con invasión venosa. En relación con el cáncer de pulmón, la observación de la expresión de antígenos de O-glicosilación incompleta (López-Ferrer et al., 2002) condujo a la hipótesis que la expresión de ppGalNAc-Ts pudiera encontrarse alterada en estos tumores. Estudios de inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal han demostrado previamente modificaciones en la expresión de la isoenzima ppGalNAc-T3. La disminución de su expresión se ha correlacionado con peor evolución, tanto en pacientes con tumores a no pequeñas células (Dosaka-Akita et al., 2002) como con adenocarcinoma pulmonar (Gu et al., 2004). Poco se conoce en relación a la expresión del resto de los miembros de esta familia de enzimas en estos tumores, lo que motivó el principal objetivo del presente trabajo. Por otro lado, nuestro grupo también identificó a la ppGalNAc-T13 como marcador de agresividad en neuroblastoma (Berois et al., 2006a) por lo que decidimos también profundizar en la caracterización de la expresión de los otros miembros de esta familia de enzimas también en estos tumores.

El estudio de la expresión de estos genes mediante RT-PCR proporciona un primer paso para la identificación de nuevos marcadores, ayudando a identificar los que presenten expresión diferencial en líneas celulares que presenten diferente comportamiento biológico. De esta manera se pueden seleccionar los que resulten más interesantes para profundizar en la caracterización de cada isoforma. Es crítico para la comprensión de las propiedades de cada enzima y su significado biológico conocer los sustratos naturales de las diferentes isoformas.

Los dos modelos de cáncer estudiados aportaron datos interesantes en la medida que han permitido identificar algunas isoenzimas que presentan expresión más restringida y en algunos casos excluyentes entre sí con otras isoenzimas de la misma familia. Este hecho ha sido observado también en otros tipos de cáncer y podría estar relacionado al comportamiento biológico.

5.1 Neuroblastoma

Este estudio permitió seleccionar en líneas celulares de este tumor algunos genes con expresión diferencial como ppGalNAc-T3, -T9, -T10, -T12, -T13 y -T15.

Llamó la atención que para 2 de las isoenzimas de expresión neuronal constitutiva (ppGalNAc-T9 y ppGalNAc-T13) se constató una expresión excluyente en las líneas del modelo metastásico IGR-N91. Mientras que ppGalNAc-T13 se sobreexpresa en la línea BM (de mayor agresividad biológica), es negativa en la línea del tumor primario PTX. Lo contrario ocurre con ppGalNAc-T9, que se expresa en la línea del tumor primario de este modelo, así como en otras líneas de comportamiento biológico menos agresivo como son las líneas de tipo S, SK-N-AS y SK-N-BE₂, pero apaga su expresión en líneas de mayor agresividad. Un estudio preliminar de 33 pacientes de neuroblastoma demostró una correlación significativa de la expresión de ppGalNAc-T9 con los resultados clínicos, permitiendo identificar pacientes con mejor evolución dentro del grupo de alto riesgo (Estadío IV, amplificación de *MYCN*, edad mayor de 12 meses) (manuscrito en preparación, anexo II). La expresión de ppGalNAc-T9 se correlacionó con los estadios tempranos pero no con el estatus del oncogén *MYCN*, y el resultado más relevante fue la asociación con la sobrevida de los pacientes. De los 20 pacientes cuyo

tumor expresaba la enzima falleció solamente 1, mientras que de los 13 pacientes que perdieron la expresión de la misma fallecieron 11.

De los pocos datos disponibles sobre la funcionalidad de esta enzima en células neuronales se desprende que puede presentar diferencias con ppGalNAc-T13, lo que sumado a la expresión opuesta de ambas en relación al comportamiento biológico de las líneas del modelo IGR-N91 de este estudio, surge la hipótesis que ambas isoenzimas pueden tener relevancia biológica en el comportamiento del neuroblastoma.

5.2 Cáncer de pulmón

De igual manera que para neuroblastoma, en las líneas de cáncer de pulmón se identificaron algunas isoenzimas con expresión diferencial: ppGalNAc-T3, -T6, -T9, -T13, -T14, y -T15. En este caso también llamó la atención que en algunas líneas celulares la expresión de ppGalNAc-T9 y -T13 se presentara como mutuamente excluyente: ppGalNAc-T9 se expresa en SK-MES1 y NCI-H1975, mientras que ppGalNAc-T13 es negativa en las mismas; y lo inverso ocurre en las líneas NCI-H1703, NCI-H526, NCI-H1755 y H69AR. Llama la atención que salvo NCI-H1703 que fue establecida a partir de un tumor estadio I, el resto de las líneas que expresan ppGalNAc-T13 presentan características que sugieren comportamientos biológicos más agresivos: tumores de estadio avanzados, establecidas a partir de focos metastásicos (hígado, médula ósea), correspondiendo 2 de ellas a la variante de cáncer de pulmón a pequeñas células, que generalmente presentan peor evolución clínica, y en el caso de la línea H69AR, expresa el gen de resistencia a drogas. Las evidencias obtenidas en el presente trabajo permiten establecer la misma hipótesis que para neuroblastoma, que ambas isoenzimas pudieran presentar diferente función en la glicobiología del cáncer de pulmón, y que la misma pueda estar implicada en el comportamiento biológico de este tumor. Un estudio detallado de la expresión de estas isoenzimas en muestras clínicas y la correlación con la evolución de los pacientes es necesario para establecer el valor de cada una como marcador pronóstico en cáncer de pulmón.

Conclusiones y perspectivas

Las evidencias disponibles sobre las alteraciones de la *O*-glicosilación asociadas al proceso de oncogénesis proporcionan una base racional para profundizar en la caracterización de diferentes moléculas involucradas en el mismo como eventuales marcadores moleculares. El presente estudio ha aportado datos interesantes sobre la expresión de la familia de enzimas ppGalNAc-Ts tanto para cáncer de pulmón como para neuroblastoma.

En primer lugar, si bien la mayoría de las isoformas presentaron en este estudio expresión ubicua en ambos tumores, hemos identificado algunas ppGalNAc-Ts que presentan expresión diferencial en varias de las líneas celulares estudiadas.

Los datos obtenidos en neuroblastoma sobre la expresión de ppGalNAc-T9 y -T13 asociadas a menor y mayor agresividad respectivamente sugieren que estas enzimas podrían estar involucradas en el comportamiento biológico de este tumor.

Un estudio preliminar de muestras clínicas de neuroblastoma sugiere que la expresión de ppGalNAc-T9 podría constituir un marcador pronóstico que permitiría estratificar pacientes con evolución favorable dentro del grupo de alto riesgo.

En algunas líneas celulares de cáncer de pulmón se ha observado un patrón similar de expresión excluyente de estas dos isoformas. Esto podría indicar también una eventual implicancia de las mismas en la biología de este tumor.

La profundización en el estudio de muestras clínicas permitiría correlacionar la expresión de estas enzimas con parámetros clínicos y evolución de los pacientes para confirmar su eventual utilidad como marcadores moleculares.

La producción de anticuerpos monoclonales anti-ppGalNAc-T9 sería de gran utilidad para la confirmación de la hipótesis planteada.

Referencias bibliográficas

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (2004) *Biología Molecular de la Célula*. Cuarta edi.
- Babino A, Oppezzo P, Bianco S, Barrios E, Berois N, Navarrete H, Osinaga E (2000) Tn Antigen is a pre-cancerous biomarker in breast tissue and serum in N-nitrosomethylurea-induced rat mammary carcinogenesis. *Cancer* 86:753-759
- Baldus SE, Engelmann K, Hanisch F-G (2004) MUC1 and the MUCs: A Family of Human Mucins with Impact in Cancer Biology. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 41:189-231
- Barnes E, Biedler J, Spengler B, Lyser K (1981) The fine structure of continuous human neuroblastoma lines SK-N-SH, SK-N-BE(2), and SK-N-MC. *In Vitro* 17:619-631
- Bennett EP, Hassan H, Clausen H (1996) cDNA cloning and expression of a novel human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine. Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-T3. *The Journal of biological chemistry* 271:17006-12
- Bennett EP, Hassan H, Mandel U, Mirgorodskaya E, Roepstorff P, Burchell J, Taylor-papadimitriou J, Hollingsworth MA, Merx G, Kessel AGV, Eiberg H, Steffensen R, Clausen H (1998) Cloning of a human UDP-N-acetyl-alpha-D-Galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase that complements other GalNAc-transferases in complete O-glycosylation of the MUC1 tandem repeat. *The Journal of biological chemistry* 273:30472-81
- Bennett EP, Hassan H, Hollingsworth MA, Clausen H (1999)(a) A novel human UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-T7, with specificity for partial GalNAc-glycosylated acceptor substrates. *FEBS Letters* 460:226-230
- Bennett EP, Hassan H, Mandel U, Hollingsworth MA, Akisawa N, Ikematsu Y, Merx G, Kessel AGV, Olofsson S, Clausen H (1999)(b) Cloning and Characterization of a Close Homologue of Human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase-T3, designated GalNAc-T6. *Biochemistry* 274:25362-25370
- Berois N, Blanc E, Ripoché H, Trajtenberg F, Cantais S, Barrois M, Dessen P, Ka B, Be J, Osinaga E, Rague G (2006)(a) ppGalNAc-T13: A New Molecular Marker of Bone Marrow Involvement in Neuroblastoma. *Clinical Chemistry* 52:1701-1712
- Berois N, Mazal D, Ubillos L, Trajtenberg F, Sastre-garau X, Magdelenat H, Osinaga E (2006)(b) UDP-N-Acetyl-D-Galactosamine:Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase-6 as a New Immunohistochemical Breast Cancer Marker. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 54:317-328
- Bhattacharjee A, Richards W, Staunton J, Li C, Monti S, Vasa P, Ladd C, Beheshti J, Bueno R, Gillette M, Loda M, Weber G, Mark E, Lander E, Wong W, Johnson B, Golub T, Sugarbaker D, Meyerson M (2001) Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling

reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:13790-5

Blanc E, Goldschneider D, Ferrandis E, Barrois M, Le Roux G, Leonce S, Douc-Rasy S, Bénard J, Raguénez G (2003) MYCN enhances P-gp/MDR1 gene expression in the human metastatic neuroblastoma IGR-N-91 model. *The American journal of pathology* 163:321-31

Brambilla E, Gazdar a (2009) Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 33:1485-97

Brockhausen I, Schachter H, Stanley P (2009) O-GalNAc Glycans. In E. M. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, ed. *Essentials of Glycobiology* Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Brodeur GM (2003) Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 3:203-216

Brooks SA, Carter TM, Bennett EP, Clausen H, Mandel U (2007) Immunolocalisation of members of the polypeptide family is consistent with biologically relevant altered cell surface glycosylation in breast cancer. *Acta Histochemica* 109:273-284

Burchell JM, Mungul A, Taylor-Papadimitriou J (2001) O-Linked Glycosylation in the Mammary Gland: Changes that Occur During Malignancy. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 6:355-364

Byrd JC, Bresalier RS (2004) Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer* 23:77-99

Carney DN, Gazdar AF, Bepler G, Carney DN, Gazdar AF, Bepler G, Guccion JG, Marangos PJ, Moody TW, Zweig MH, Minna JD (1985) Establishment and Identification of Small Cell Lung Cancer Cell Lines Having Classic and Variant Features. *Cancer Research* 45:2913-2923

Cheng L, Tachibana K, Iwasaki H, Kameyama A, Zhang Y, Kubota T, Hiruma T, Tachibana K, Kudo T, Guo J-ming, Narimatsu H (2004) Characterization of a novel human UDP-GalNAc transferase, pp-GalNAc-T15. *FEBS letters* 566:17-24

Cheng L, Tachibana K, Zhang Y, Guo J-ming, Tachibana Kahori K, Kameyama A, Wang H, Hiruma T, Iwasaki H, Togayachi A, Kudo T, Narimatsu H (2002) Characterization of a novel human UDP-GalNAc transferase, pp-GalNAc-T10. *FEBS letters* 531:115-121

Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, Biedler JL, Ross RA (1989) Phenotypic Diversification in Human Neuroblastoma Cells: Expression of Distinct Neural Crest Lineages. *Cancer Research* 49:219-225

Coate LE, John T, Tsao M-S, Shepherd F a (2009) Molecular predictive and prognostic markers in non-small-cell lung cancer. *The lancet oncology* 10:1001-10

Collins LG, Haines C, Perkel R, Enck RE (2007) Lung cancer: diagnosis and management. *American family physician* 75:56-63

- Croce CM (2008) Oncogenes and Cancer. The New England journal of medicine 358:502-511
- Dosaka-Akita H, Kinoshita I, Yamazaki K, Izumi H, Itoh T, Katoh H, Nishimura M, Matsuo K, Yamada Y, Kohno K (2002) N-acetylgalactosaminyl transferase-3 is a potential new marker for non-small cell lung cancers. British journal of cancer 87:751-5
- Ferrandis E, Bénard J (1993) Activation of the human MDR1 gene promoter in differentiated neuroblasts. International Journal of Cancer 54:987-991
- Ferrandis E, Silva JD, Riou G, Bénard I (1994) Coactivation of the MDR1 and MYCN Genes in Human Neuroblastoma Cells during the Metastatic Process in the Nude Mouse. Cancer Research:2256-2261
- Finn OJ (2008) Cancer immunology. The New England journal of medicine 358:2704-2715
- Fogh J, Fogh J, Orfeo T (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. Journal of the National Cancer Institute 59:221-226
- Foulkes WD (2008) Inherited susceptibility to common cancers. The New England journal of medicine 359:2143-53
- Freire T, Osinaga E (2003) Immunological and biomedical relevance of the Tn antigen. Inmunología 22:27-38
- Freire T, Berois N, Sónora C, Varangot M, Barrios E, Osinaga E (2006) UDP-N-acetyl- D -galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 (ppGalNAc-T6) mRNA as a potential new marker for detection of bone marrow-disseminated breast cancer cells. International Journal of Cancer 119:1383-1388
- Gerlinger M, Swanton C (2010) How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. British journal of cancer 103:1139-1143
- Giard D, Aaronson S, Todaro G, Arnstein P, Kersey J, Dosik H, Parks W (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. Journal of the National Cancer Institute 51:1417-1423
- Gomes J, Marcos NT, Berois N, Osinaga E, Magalhães A, Pinto-de-sousa J, Almeida R, Gärtner F, Reis CA (2009) Expression of UDP-N-acetyl- D -galactosamine : Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-6 in Gastric Mucosa , Intestinal Metaplasia , and Gastric Carcinoma The Journal of Histochemistry & Cytochemistry. Histochemistry 57:79-86
- Gu C, Oyama T, Osaki T, Li J, Takenoyama M, Izumi H, Sugio K, Kohno K, Yasumoto K (2004) Low expression of polypeptide GalNAc N-acetylgalactosaminyl transferase-3 in lung adenocarcinoma: impact on poor prognosis and early recurrence. British Journal of Cancer 90:436 - 442
- Guo J-ming, Chen H-li, Wang G-min, Zhang Y-kang, Narimatsu H (2004) Expression of UDP-GalNAc:Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase-12 in Gastric and Colonic Cancer Cell Lines and in Human Colorectal Cancer. Oncology 67:271-276

- Guo J-M, Zhang Y, Cheng L, Iwasaki H, Wang H, Kubota T, Tachibana K, Narimatsu H (2002) Molecular cloning and characterization of a novel member of the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, pp-GalNAc-T12. *FEBS letters* 524:211-218
- Hanahan D, Weinberg RA, Francisco S (2000) The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100:57-70
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144:646-674
- Hang HC, Bertozzi CR (2005) The chemistry and biology of mucin-type O-linked glycosylation. *Architecture* 13:5021-5034
- Hanisch FG, Reis C a, Clausen H, Paulsen H (2001) Evidence for glycosylation-dependent activities of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases rGalNAc-T2 and -T4 on mucin glycopeptides. *Glycobiology* 11:731-40
- Hanisch F-G (2001) O-Glycosylation of the Mucin Type. *Biological Chemistry* 382:143-149
- Inoue T, Eguchi T, Oda Y, Nishiyama K, Fujii K, Izumi H, Kohno K, Yamaguchi K, Tanaka M, Tsuneyoshi M (2007) Expression of GalNAc-T3 and its relationships with clinicopathological factors in 61 extrahepatic bile duct carcinomas analyzed using stepwise sections - special reference to its association with lymph node metastases-. *Modern pathology* 20:267-76
- Ishikawa M, Kitayama J, Nariko H, Kohno K (2004) The Expression Pattern of UDP-N-Acetyl-a- D -Galactosamine : Polypeptide N-Acetylgalactosaminyl Transferase-3 in Early Gastric Carcinoma. *Journal of Surgical Oncology* 86:28-33
- Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Delattre O (2010) Molecular pathogenesis of peripheral neuroblastic tumors. *Oncogene* 29:1566-1579
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ (2010) Cancer statistics, 2008. *CA: a cancer journal for clinicians* 58:71-96
- Jemal A, Thun MJ, Ries L a G, Howe HL, Weir HK, Center MM, Ward E, Wu X-C, Ehemann C, Anderson R, Ajani U a, Kohler B, Edwards BK (2008) Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *Journal of the National Cancer Institute* 100:1672-94
- Kannagi R, Izawa M, Koike T, Miyazaki K, Kimura N (2004) Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer science* 95:377-84
- Kohsaki T, Nishimori I, Nakayama H, Miyazaki E, Enzan H, Nomoto M, Hollingsworth M, Onishi S (2000) Expression of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase isozymes T1 and T2 in human colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology* 35:840 - 8
- Landers KA, Burger MJ, Tebay MA, Purdie DM, Scells B, Samarasinghe H, Lavin MF, Gardiner RA (2005) Use of multiple biomarkers for a molecular diagnosis of prostate cancer. *International Journal of Cancer* 114:950-956
- López-Ferrer A, Barranco C, Bolós CD (2002) Differences in the O-Glycosylation Patterns Between Lung Squamous Cell Carcinoma and Adenocarcinoma. *American Journal of Clinical Pathology* 118:749-755

- Mandel U, Hassan H, Therkildsen M, Rygaard J, Jakobsen M, Juhl B, Dabelsteen E, Clausen H (1999) Expression of polypeptide GalNAc-transferases in stratified epithelia and squamous cell carcinomas: immunohistological evaluation using monoclonal antibodies to three members of the GalNAc-transferase family. *Glycobiology* 9:43-52
- Maris JM (2010) Recent Advances in Neuroblastoma. *New England Journal of Medicine* 362:2202-2211
- Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL (2007) Neuroblastoma. *Lancet* 369:2106-20
- Mirski SEL, Gerlach JH, Cole SPC (1987) Multidrug Resistance in a Human Small Cell Lung Cancer Cell Line Selected in Adriamycin. *Cell* 47:2594-2598
- Miyahara N, Shoda J, Kawamoto T, Furukawa M, Ueda T, Todoroki T, Tanaka N, Matsuo K, Yamada Y, Kohno K, Irimura T (2004) Expression of UDP-N-Acetyl- -D-Galactosamine-Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase Isozyme 3 in the Subserosal Layer Correlates with Postsurgical Survival of Pathological Tumor Stage 2 Carcinoma of the Gallbladder. *Clinical Cancer Research* 10:2090-2099
- Nair A, Klusmann M, Jageesvaran K, Grubnic S, Green S, Vlahos I (2011) Revisions to the TNM Staging of Non-Small Cell Lung Cancer: Rationale, Clinoradiologic Implications, and Persistent Limitations. *Radiographics* 31:215-238
- Nguyen DX (2011) Tracing the origins of metastasis. *The Journal of pathology* 223:196-205
- Onitsuka K, Shibao K, Nakayama Y, Minagawa N, Hirata K, Izumi H, Nagata N, Kitazato K, Kohno K, Itoh H (2003) Prognostic significance of UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-3 (GalNAc-T3) expression in patients with gastric carcinoma. *Cancer Science* 94:1-5
- Pao W, Girard N (2011) New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *The lancet oncology* 12:175-80
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global Cancer Statistics, 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 55:74-108
- Patsos G, Klein A, Martin RS, Masselot D, Graessmann M (2007) O-glycan regulation of apoptosis and proliferation in colorectal cancer cell lines. *Biochemical Society Transactions* 35:1372-1374
- Patz EF (2000) Imaging Bronchogenic Carcinoma. *Chest* 117:90S-95S
- Phelps RM, Johnson BE, Ihde DC, Gazdar a F, Carbone DP, McClintock PR, Linnoila RI, Matthews MJ, Bunn P a, Carney D, Minna JD, Mulshine JL (1996) NCI-Navy Medical Oncology Branch cell line data base. *Journal of cellular biochemistry. Supplement* 24:32-91
- Pratt MR, Hang HC, Hagen KGT, Rarick J, Gerken TA, Tabak LA, Bertozzi CR (2004) Deconvoluting the Functions of Polypeptide N-alpha -Acetylgalactosaminyltransferase Family Members by Glycopeptide Substrate Profiling. *Chemistry & Biology* 11:1009-1016

- Reis CA, Osorio H, Silva L, Gomes C, David L (2010) Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *Journal of Clinical Pathology* 63:322-329
- Rini J, Esko J, Varki A (2009) Glycosyltransferases and Glycan- processing Enzymes. In E. M. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, ed. *Essentials Of Glycobiology* Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ross RA, Biedler JL, Spengler BA (2003) A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. *Cancer Letters* 197:35-39
- Schiller J, H. Sabatini L, Bittner G, Pinkerman C, Mayotte J, Meisner L, Levitt M (1994) Phenotypic, molecular, and genetic characterization of transformed human bronchial epithelial cell strains. *International Journal of Oncology* 4:461-470
- Schwientek T, Bennett EP, Flores C, Thacker J, Hollmann M, Reis CA, Behrens J, Mandel U, Keck B, Schäfer MA, Haselmann K, Zubarev R, Roepstorff P, Burchell JM, Taylor-Papadimitriou J, Hollingsworth MA, Clausen H (2002) Functional conservation of subfamilies of putative UDP-N-acetylgalactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases in *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, and mammals. One subfamily composed of I(2)35Aa is essential in *Drosophila*. *The Journal of Biological Chemistry* 277:22623-38
- Seeger RC, Rayner SA, Banerjee A, Benedict WF, Chung H, Laug WE, Neustein HB (1977) Morphology, Growth, Chromosomal Pattern, and Fibrinolytic Activity of Two New Human Neuroblastoma Cell Lines. *Cancer Research* 37:1364-1371
- Shibao K, D P, Izumi H, D P, Ohta R, Nagata N, D P, Matsuo K-ichi, Yamada Y, D P, Kitazato K, D P, Itoh H, D P (2002) Expression of UDP-N-Acetyl- α -D-Galactosamine– Polypeptide GalNAc N-Acetylgalactosaminyl Transferase-3 in Relation to Differentiation and Prognosis in Patients with Colorectal Carcinoma. *Cancer* 94:1939-1946
- Strous GJ (1979) Initial glycosylation of proteins with acetylgalactosaminylserine linkages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:2694-8
- Sutherlin ME, Nishimori I, Caffrey T, Bennett EP, Hassan H, Mandel U, Mack D, Iwamura T, Clausen H, Hollingsworth MA (1997) Expression of Three UDP- N-acetyl- -D-galactosamine:Polypeptide GalNAc N-Acetylgalactosaminyltransferases in Adenocarcinoma Cell Lines. *Cancer Research* 57:4744-4748
- Ten Hagen KG, Bedi GS, Tetaert D, Kingsley PD, Hagen FK, Balys MM, Beres TM, Degand P, Tabak LA (2001) Cloning and characterization of a ninth member of the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, ppGaNTase-T9. *The Journal of Biological Chemistry* 276:17395-404
- Ten Hagen KG, Fritz TA, Tabak LA (2003) All in the family: the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology* 13:1-16
- Thiele CJ (1998) Neuroblastoma Cell Lines. *Human Cell* 1:1-35
- Toba S, Tenno M, Konishi M, Mikami T, Itoh N, Kurosaka A (2000) Brain-specific expression of a novel human UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc-T9). *Biochimica et Biophysica Acta* 1493:264-268

- Travis W, Travis L, Devesa S (1995) Lung Cancer. *Cancer* 1:191-202
- Tubiana M (2008) Généralités sur la cancérogenèse. *Comptes Rendus Biologies* 331:114-125
- Tumilowicz JJ, Nichols WW, Cholon JJ, Greene AE (1970) Definition of a Continuous Human Cell Line Derived from Neuroblastoma. *Cancer Research* 30:2110-2118
- Varki A, Kannagi R, Toole BP (2009) Glycosylation Changes in Cancer In E. M. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, ed. *Essentials of Glycobiology* Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vermeulen J, De Preter K, Mestdagh P, Laureys G, Speleman F, Vandesompele J (2010) Predicting outcomes for children with neuroblastoma. *Discovery medicine* 10:29-36
- Wang H, Tachibana K, Zhang Y, Iwasaki H, Kameyama A, Cheng L, Guo J-ming, Hiruma T, Togayachi A, Kudo T, Kikuchi N, Narimatsu H (2003) Cloning and characterization of a novel UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, pp-GalNAc-T14. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300:738-744
- Westermann F, Schwab M (2002) Genetic parameters of neuroblastomas. *Cancer Letters* 184:127-147
- White KE, Lorenz B, Evans WE, Meitinger T, Strom TM, Econs MJ (2000) Molecular cloning of a novel human UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-T8, and analysis as a candidate autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) gene. *Gene* 246:347-356
- White T, Bennett EP, Takio K, Sørensen T, Bonding N, Clausen H (1995) Purification and cDNA cloning of a human UDP-N-acetyl- α -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry* 270:24156-24165
- Yamamoto S, Nakamori S, Tsujie M, Takahashi Y, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Tomita Y, Hoshida Y, Aozasa K, Kohno K, Monden M (2004) Expression of Uridine Diphosphate N-Acetyl- α -D-Galactosamine: Polypeptide N-Acetylgalactosaminyl Transferase 3 in Adenocarcinoma of the Pancreas. *Pathobiology* 71:12-18
- Zhang Y, Iwasaki H, Wang H, Kudo T, Kalka TB, Hennet T, Kubota T, Cheng L, Inaba N, Gotoh M, Togayachi A, Guo J, Hisatomi H, Nakajima K, Nishihara S, Nakamura M, Marth JD, Narimatsu H (2003) Cloning and Characterization of a New Human UDP-N-Acetyl- α -D-galactosamine:Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase, Designated pp-GalNAc-T13, That Is Specifically Expressed in Neurons and Synthesizes GalNAc α -Serine/Threonine Antigen. *The Journal of Biological Chemistry* 278:573-584

Anexo I

Western Blot

Buffer de Lisis

- Tris 10mM
- KCl 5Mm
- CaCl_2 2mM
- MgCl_2 1mM
- PMSF, Aprotinina, Pefbloc. (Inhibidores de proteasas)

Electroforesis bidimensional

Buffer de lisis

- 40 mM Tris base
- 7 M Urea
- 2 M Tiourea
- 4% CHAPS
- 1 mM PMSF

Solución de fijación

- 12% ácido acético
- 50% etanol
- 0,5mL/L formaldehido 37%

Solución de revelado

- 3% Na_2CO_3
- 200 μL de la solución 10X de tiosulfato.
- 0,5mL/L formaldehido

Anexo II

Lack of *GALNT9* expression characterizes high-risk neuroblastoma

**Nora Berois^{1-2*}, Enrique Barrios³, Laura Capandeguy¹, Sétha Douc-Rasy⁴,
Dominique Valteau-Couanet⁵, Eduardo Osinaga¹⁻⁶, Jean Bénard^{4-7*}.**

1- Laboratorio de Oncología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo, Mataojo 2020, Montevideo CP 11400, Uruguay.

2- Laboratorio de Oncología Básica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Avda. General Flores 2125, Montevideo CP 11800, Uruguay.

3- Departamento de Métodos Cuantitativos, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Avda. General Flores 2125, Montevideo CP 11800, Uruguay.

4- Interactions Moléculaires et Cancer, Centre National de Recherche Scientifique – Unité Mixte de Recherche 8126-Université Paris-Sud 11, Institut Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France.

5- Département de Pédiatrie Oncologique, Institut Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France.

6- Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Avda. General Flores 2125, Montevideo CP 11800, Uruguay.

7- Département de Biologie et Pathologie Médicales, Institut Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France.

Running title: *GALNT9* gene expression in neuroblastoma

***Corresponding authors** Nora Berois, Laboratorio de Oncología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo, Mataojo 2020, Montevideo CP 11400, Uruguay. Phone: (598)2 522 09 10, Fax: (598)2 522 41 85, e-mail: nberois@pasteur.edu.uy and Jean Bénard, Département de Biologie et Pathologie Médicales, Institut Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France. Phone: (33)1 42 11 48 18, Fax: (33)1 42 11 44 01, e-mail: jean.benard@igr.fr

ABSTRACT

BACKGROUND: Neuroblastoma is the second leading cause of cancer-related death in children. Clinicians need prognostic markers to optimize therapy for individual patients, especially those with high-risk disease. Associations have been observed between the cell surface expression of *O*-glycan and a malignant phenotype and between the expression of several ppGalNAc-transferases (ppGalNAc-Ts) and clinical behavior in various cancers.

METHODS: We evaluated the expression of thirteen *GALNT* genes at the mRNA level in a panel of neuroblastoma cell lines using RT-PCR. Then we assessed the expression of *GALNT9* gene in primary neuroblastoma tumors.

RESULTS: We found that the brain-specific *GALNT9* gene was expressed in S-type neuroblasts (SK-N-AS cell line) but not in N-type neuroblasts (SH-SY5Y, IMR-31, LAN-1 and LAN-5 cell lines). We also found *GALNT9* expression in the primary tumor xenograft but not in bone marrow metastatic cells from the human high-risk neuroblastoma model IGR-N-91. In primary neuroblastoma tumors from a cohort of 33 patients, *GALNT9* expression showed a positive correlation with good outcome, in agreement with survival data. Importantly, *GALNT9* expression correlating with a favorable clinical outcome in high-risk patients, provides a new marker for the prognostic stratification of these aggressive forms of neuroblastoma.

CONCLUSION: Taken together, our findings support the hypothesis that *O*-glycosylation alterations contribute to the malignant behavior of neuroblastoma and demonstrate the potential usefulness of *GALNT9* expression analysis in the management of high-risk neuroblastoma patients.

Key words: *GALNT9*, neuroblastoma, glycobiology, tumor marker

1 INTRODUCTION

2 Neuroblastoma, which arises from primordial neural crest cells and is the most common
3 malignant solid tumor diagnosed during infancy, accounts for 10% of all childhood
4 cancers (Kim, 2006). The biology of neuroblastoma may be extremely variable since
5 certain tumors spontaneously regress, while others—the majority—are highly
6 aggressive. A panel of prognostic factors including age at diagnosis, tumor burden,
7 histopathology, DNA index and *MYCN* status is used to determine risk categories
8 (Maris, 2005). In a recent study, genomic analyses were used for the genomic
9 stratification of all clinical forms of neuroblastoma at diagnosis (Janoueix-Lerosey,
10 2009). About 50% of neuroblastomas are considered high risk at diagnosis. These
11 consist of *MYCN*-amplified neuroblastoma and/or stage-IV neuroblastoma in patients
12 older than 12 months. Conventional intensive multimodal therapies are insufficient for
13 high-risk patients as long-term survival is achieved in less than one third of patients
14 (Maris, 2007).

15
16 Alterations in glycan profiles are a hallmark of cancer development linked to the
17 expression of tumor-associated carbohydrate antigens (Dube, 2005). Abnormal O-
18 glycans expressed by cancer cells greatly contribute to the malignant phenotype and
19 play an important functional role in cell adhesion, invasion, and metastasis
20 (Brockhausen, 2006). The most abundant form of O-linked glycosylation in higher
21 eukaryotes, termed “mucin-type”, is initiated in the Golgi apparatus by the covalent
22 linkage of an α -N-acetylgalactosamine residue (GalNAc) to the hydroxyl group of
23 Ser/Thr residues (Hanisch, 2001), catalyzed by the UDP-GalNAc:polypeptide-N-acetyl-
24 galactosaminyl-transferases (ppGalNAc-T) (EC 2.4.1.41) (Ten Hagen, 2003).

1 α GalNAc-Ser/Thr is then further elongated by other glycosyltransferases to generate
2 complex O-glycans. ppGalNAc-T is a complex family of isoenzymes, of which 15
3 members have been characterized to date (Ten Hagen, 2003; Wang, 2003; Cheng,
4 2004). A total of 24 members, however, are predicted by *in silico* analysis. While
5 certain isoforms are broadly expressed, others are restricted in their distribution and
6 activity to certain cells or tissues (Ten Hagen, 2003). It has been demonstrated that
7 individual ppGalNAc-Ts have distinct activities (Pratt, 2004) and that O-glycosylation
8 in a given cell is regulated by the repertoire of the isoenzymes expressed in that cell
9 (Brockhausen, 2006).

10
11 ppGalNAc-Ts have been found to be differentially expressed in malignant tissue
12 compared to normal tissue (Mandel, 1999; Nomoto, 1999; Kohsaki, 2000; Rajpert-De
13 Meyts, 2007), and increasing evidence suggests that these enzymes might be useful
14 tumor markers. ppGalNAc-T3 expression, for example, has been shown to correlate
15 with prognosis in patients with colorectal and gallbladder cancer (Shibao, 2002;
16 Miyahara, 2004). Our research group has demonstrated that ppGalNAc-T6 is expressed
17 in breast cancer but not in normal breast epithelium, both at the mRNA (Freire, 2006)
18 and protein (Berois, 2006b) levels. Using a RT-PCR assay, we identified an association
19 between ppGalNAc-T6 expression in bone marrow samples and poor clinical outcome
20 in lymph node-negative breast cancer patients (Freire, 2006). We have also shown that
21 *GALNT13*, the gene encoding the ppGalNAc-T13 isoenzyme (Zhang, 2003), might be a
22 novel molecular marker of bone marrow involvement in patients with
23 neuroblastoma (Berois, 2006a). Using the metastatic cell line model of human
24 neuroblastoma IGR-N-91 (Ferrandis, 1994; Blanc, 2003), we also found by microarray

gene expression analysis that *GALNT13* was the most strongly up-regulated gene in metastatic neuroblasts compared with primary tumor (Berois, 2006a). In the same study, we evaluated tyrosine hydroxylase, ganglioside D2 synthase, dopa decarboxylase, and *GALNT13* transcripts in bone marrow aspirates from the same patients with neuroblastoma in order to evaluate whether *GALNT13* might be useful for disseminated disease detection, and found that *GALNT13* expression in bone marrow at diagnosis was the strongest predictor of poor clinical outcome. On the basis of this evidence, in the present study we aimed to analyze the expression of thirteen *GALNT* genes at the mRNA level in a panel of neuroblastoma cell lines, including the IGR-N-91 model. Since we found the brain-specific isoform *GALNT9* (Toba, 2000) to be mainly expressed in neuroblasts displaying low-aggressive behavior, we assessed the expression of this enzyme in primary neuroblastoma tumors. Our findings strongly suggest that *GALNT9* expression is associated with better clinical outcome in patients with neuroblastoma and in particular in patients with high-risk neuroblastoma.

MATERIAL AND METHODS

Patients and clinical samples.

Snap-frozen tumor samples were collected at diagnosis from 33 patients with varying stages of neuroblastoma, including both *MYCN*-amplified and non-amplified tumors (Table 1). The tumors were carefully selected on the basis of containing more than 70% of malignant tumor cells. Experiments were performed using 35- μ m-thick tumor slices flanked by 5- μ m histological controls with an immature malignant neuroblast population of greater than 70%. Total RNA was extracted using RNAble reagent (Eurobio, Les Ulis, France, www.eurobio.fr) and purified with the RNeasy System

(Qiagen S.A., Courtaboeuf Cedex, France, www.qiagen.com) in accordance with the manufacturer's recommendations. The quality of total RNA samples was established by testing for a 28S:18S rRNA ratio of over 1.7 using an Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Inc., Massy Cedex, France, www.agilent.com).

Cell lines.

The neuroblastoma metastatic model, IGR-N-91, which was derived from a high-risk neuroblastoma, has been previously described (Ferrandis, 1994; Blanc, 2003). Briefly, the parental cell line was established from neuroblasts from the bone marrow of an 8-year-old boy and successively xenografted into nude mice. The derived cell lines were established from primary tumor (PTX) and bone marrow metastasis (BM). The other neuroblastoma cell lines evaluated (IMR-32, SH-SY5Y, SK-N-AS, SK-N-BE(2), LAN-1 and LAN-5) were obtained from various originators (Thiele, 1998). The cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2 mmol/L L-glutamine, 1 mmol/L sodium pyruvate, 10 µg/ml gentamicin, and 10% fetal calf serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, www.invitrogen.com) at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. We harvested the cells grown in monolayer by incubation with PBS containing 0.53 mM EDTA and 0.05% trypsin (Invitrogen, Carlsbad, CA, www.invitrogen.com) for 5 min at 37°C. The cells were washed in PBS and suspended in Tri-Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, www.sigmaaldrich.com) for RNA extraction. The Tri-Reagent suspension was stored at -80°C until use.

RT-PCR

First-strand cDNA was synthesized using 1 µg of cell lines and primary tumor total RNA by MMLV reverse transcriptase (Amersham, Piscataway, NJ, www.amersham.com). Two hundred units of the enzyme, in the presence of 2 µl of 10 mM of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP) and 1 µl containing 250 ng of random hexamers, were used in a 20-µl total reaction volume. After incubation at 37°C for 1 hr, the mixture was heated to 96°C, snap-cooled and stored at -20°C until use. Different RT-PCR reactions were run with the respective negative controls to amplify the members of the *GALNT* family. The primer sequences are shown in Supplemental Data Table 1. The β2-microglobulin gene was amplified in order to verify cDNA quality. One µl of cDNA was added to a final volume of 25 µl of a PCR mixture containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 400 nM of each primer, and 1 unit of Taq DNA polymerase (Fermentas, Glen Burnie, MD, www.fermentas.com). Amplification was performed under the following conditions: a) for ppGalNAc-T1, -T2, -T4, -T6, -T7, -T9 and -T15, 30 sec at 95°C, 30 sec at 60°C, and 1 min at 72°C for 35 cycles; b) for ppGalNAc-T3, -T10, -T11, -T12 and -T14, 30 sec at 95°C, 30 sec at 56°C and 1 min at 72°C for 35 cycles; and c) for ppGalNAc-T13, as above but with an annealing temperature of 62°C. The PCR products (15 µl) were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gels and direct visualization after ethidium bromide staining.

Statistical analysis

Overall survival (defined as the time from diagnosis until the date of death or last follow-up) was used as the follow-up endpoint. The product-limit (Kaplan-Meier) method was used to estimate survival time distributions and univariate log rank tests

were used to test differences between groups. Statistical calculations were carried out using SAS software (SAS Institute Inc).

RESULTS

GALNT family gene expression in human neuroblastoma cell lines.

In order to evaluate the expression pattern of *GALNT* genes in neuroblastoma, we designed a RT-PCR assay for all the members of the gene family (*GALNT1* to *GALNT15*) except *GALNT5* and *GALNT8* because their function is still unknown for human isoforms. On comparing the two cell lines derived from the human neuroblastoma IGR-N-91 model—the PTX cell line and the BM cell line—we found that several enzymes were expressed in both cell lines (*GALNT1*, -2, -4, -6, -7, -12, and -14), two enzymes were expressed in the BM but not in the PTX cell line (*GALNT11* and *GALNT13*), and only one enzyme (*GALNT9*) was expressed in the PTX but not in the BM cell line (Figure 1). On examining enzyme expression in a panel of six neuroblastoma cell lines (Table 2), we found high levels of *GALNT1*, -2, -4, -6, -7, -11, -12, -13 and -14 in almost all the cell lines but low or inexistent levels of *GALNT3* and -10. In contrast, we found that *GALNT9* displayed a very restricted expression pattern since it was identified only in SK-N-AS and SK-N-BE(2) cell lines. Two main phenotypes, differing in biological properties, have been described in human neuroblast cell lines. These are neuroblastic (N-type) cells and substrate-adherent (S-type) cells. N-type cells are fast growing, clonogenic in soft agar, and tumorigenic in nude mice, whereas S-type cells exhibit a less malignant phenotype (Biedler, 1988). The results for *GALNT9* expression are very interesting because this brain-specific glycosyltransferase was found only in the low-aggressive IGR-N-91 PTX cells and the S-type neuroblasts (SK-N-AS cell line). It was not detected in either the IGR-N-91 BM cells or the N-type

neuroblasts (SH-SY5Y, IMR-31, LAN-1 and LAN-5 cell lines). Interestingly, *GALNT9* was also expressed in SK-N-BE(2) cells (a mixed cell line containing both epithelioid and neuroblastoid sub-populations), from which several clonal sublines of S-type and N-type have been established (Piacentini, 1996; Ciccarone, 1989). Taken as a whole, this evidence led us to choose *GALNT9* gene for further evaluation in clinical samples.

GALNT9 expression in primary human neuroblastoma tumors.

An assessment of *GALNT9* expression in clinical samples at the mRNA level was performed in primary neuroblastoma tumors from 33 documented children as shown in Table 1. We found *GALNT9* expression in 20/33 tumors (60.6%). The relationship between *GALNT9* expression and tumor stage and *MYCN* status is shown in Fig. 2. *GALNT9* was expressed in most patients with early-stage disease (stages I and II) (12/13; 98.3%) but in only 5/15 (33.3%) of those with stage IV disease ($p = 0.005$). The relationship between *MYCN* status and *GALNT9* was not significant, with *GALNT9* expressed in 16/25 patients with normal *MYCN* status (80%) and in 3/7 patients with *MYCN* amplification (42%) ($p = 0.5$) (Fig. 2). Two risk groups, low and high, were established considering *MYCN* status as an independent prognostic factor, together with disseminated disease (stage IV) and age: high-risk neuroblastoma (including patients with *MYCN*-amplified tumors and /or stage IV patients aged over 12 months [$n = 16$]) and low-risk neuroblastoma (patients with normal *MYCN* expression and localized disease [$n = 17$]). *GALNT9* was expressed in 15/17 (88.2%) of patients in the low-risk group compared to in 5/16 (31.2%) of those in the high-risk group.

Twelve of the 33 patients died during follow-up (median, 50 months; range, 1-152 months) (Table 1). The mortality rate was 68.7% (11/16 patients) in the high-risk group and just 5.8% (1/17) in the low-risk group (Table 3). There was also a noteworthy difference in terms of clinical outcome between patients who expressed *GALNT9* and those who did not: only 1/20 patients (5%) in the first group died compared to 11/13 (84.6%) in the second group (Table 3). In the low-risk group ($n = 17$), all of the patients expressing *GALNT9* were still alive at follow-up (15/15); of the 2 patients not expressing *GALNT9*, 1 died (Table 3). The correlations observed between overall survival and both low-risk/high-risk disease and *GALNT9* expression are shown in Fig. 3A and B respectively, with poor clinical outcome being strongly correlated with high-risk neuroblastoma ($p < 0.0003$) and lack of *GALNT9* expression ($p < 0.0001$). Five of the 16 patients in the high-risk group expressed *GALNT9*. Importantly, the consideration of *GALNT9* expression in addition to the presence of high-risk neuroblastoma enabled the identification of patients with better clinical outcome (Fig. 3C), with 4/5 patients expressing *GALNT9* still alive at follow-up (80%) compared to just 1/11 of those without *GALNT9* (9%) (Table 3).

DISCUSSION

Altered glycosylation is a universal feature of cancer cells, and some glycan structures are well-known markers of tumor progression. Previous studies have linked specific ganglioside changes in human neuroblastoma tumors to differences in biological behavior and clinical outcome (Kaucic, 2001; Hettmer, 2003). *GALNT13* was recently found to be the most strongly up-regulated gene (12-fold higher) in metastatic neuroblasts compared with primary tumor (Berois, 2006a), suggesting that changes in

O-glycosylation might also be associated with neuroblastoma biology. Considering the lack of information regarding *GALNT* expression in neuroblastoma, for the present study we decided to analyze all the members of the human *GALNT* gene family using a panel of well-characterized neuroblastoma cell lines. The most interesting observations were that: i) *GALNT9* was expressed in the PTX but not in the BM cells from the IGR-N-91 model, and ii) *GALNT9* was expressed in low-aggressive S-type neuroblasts (SK-N-AS cell line) but not in N-type neuroblasts (SH-SY5Y, IMR-31, LAN-1 and LAN-5 cell lines). These findings could be of particular significance because, compared to N-type cells, S-type cell subtypes have been reported to exhibit weaker invasiveness and metastatic properties (Ara, 2006), a lower growth capacity *in vivo* (Piacentini, 1996) and a higher spontaneous apoptosis rate (Hopkins-Donaldson, 2000). Because great heterogeneity, both in cellular composition and therapeutic response, is recognized as a hallmark of neuroblastoma, the characterization of S- and N-type phenotypes might be of clinical relevance (Ross, 2003).

GALNT9 expression was initially thought to be exclusive to the brain, with mRNA levels most abundant in the cerebellum and less so in the cerebral cortex, frontal lobe, temporal lobe, and putamen (Toba, 2000). The human *GALNT9* gene, located on chromosome 12q24.33, contains 7 exons with a length of 2680 base pairs, which encode a type-II trans-membrane protein of 603 amino acids (Toba, 2000). Functional analysis has shown that ppGalNAc-T9 is able to glycosylate a synthetic peptide (SDC284) derived from syndecan-3 (expressed in neuronal cells) but possesses no activity for the transfer of GalNAc to three other peptides (SDC106, -155, and -165) derived from syndecan-3 (Zhang, 2003). These results, which contrast with those observed for

1 ppGalNAc-T13 (which showed positive activity toward most of the syndecan-3-derived
2 peptides evaluated), suggest that ppGalNAc-T9 also displays a very restricted
3 specificity for the acceptor substrate. These functional differences observed between
4 ppGalNAc-T9 and ppGalNAc-T13, in combination with the fact that both enzymes
5 display an opposing expression pattern (*e.g.*, *GALNT13* is over-expressed in BM and
6 deficient in PTX cells) (Berois, 2006a) raise the hypothesis that they could be of
7 biological relevance in neuroblastoma behavior.

8
9 Our analysis of 33 neuroblastoma primary tumors revealed an association between
10 *GALNT9* expression and early, localized disease (stages I and II) but not *MYCN* status.
11 We also found a significant association between *GALNT9* expression and overall
12 survival, with results suggesting that positive *GALNT9* expression might predict
13 favorable prognosis in patients with neuroblastoma ($p < 0.0001$). Although the series
14 analyzed is too small to allow definite conclusions to be drawn, it is important to note
15 that mortality was clearly higher in the high-risk than in the low-risk group ($p <$
16 0.0003). Perhaps one of the most interesting findings emerging from our analysis was
17 the fact that *GALNT9* expression predicted a favorable clinical outcome in patients with
18 high-risk neuroblastoma (*MYCN* amplification and/or stage IV and an age of over 12
19 months). Although clinical stage and *MYCN* status are the most important clinical and
20 biological prognostic factors for neuroblastoma, prognosis is heterogeneous in high-risk
21 groups. Assessing *GALNT9* expression in these patients could enable an additional
22 biological stratification of tumors by helping to identify cases with a better clinical
23 outcome.

1 The observation that *GALNT9* might negatively regulate the aggressiveness of
2 neuroblastoma led us to speculate about the mechanism by which this
3 glycosyltransferase might control neuroblastoma behavior. One possible explanation is
4 that *GALNT9* is a marker for more mature stages of neuroblastic tumor cells, which
5 would be associated with less aggressive tumor cells such as S-type neuroblasts. It has
6 been demonstrated that S-type cells are more susceptible to Apo2L/TRAIL-mediated
7 apoptosis than N-type cells due to their expression of caspase-8 (Hopkins-Donaldson,
8 2000). Recent studies have provided evidence that O-glycosylation pathways play a role
9 in the regulation of cell growth by modifying the rate of apoptosis of cancer cells
10 (Valenzuela, 2007; Patsos, 2009). In another recent study, Wagner *et al.* (Wagner, 2007)
11 elucidated the molecular basis of a link between apoptotic signaling and death-receptor
12 O-glycosylation mediated by ppGalNAc-T14. Apo2L/TRAIL stimulates cancer cell
13 death in pancreatic carcinoma, non-small-cell lung carcinoma and melanoma cell lines
14 through the pro-apoptotic receptors DR4 and DR5. The authors demonstrated that
15 ppGalNAc-T14 catalyzed the O-glycosylation of DR4 and DR5, a key step in the
16 promotion of ligand-stimulated clustering, which mediates recruitment and activation of
17 the apoptosis-initiating protease caspase-8. In this context, a detailed study exploring a
18 probable relationship between *GALNT9* expression and apoptosis rate in neuroblasts,
19 and in S-type cells in particular, is necessary to investigate this hypothesis.

20
21 In conclusion, our results suggest that *GALNT9* expression may be a prognostic factor
22 in neuroblastoma and also support the hypothesis that alterations in O-glycosylation
23 contribute to the clinical behavior of this tumor. To extend our observations and
24 confirm the clinical value of this marker, a follow-up study of a larger number of high-

1 risk neuroblastoma cases including analysis at the protein level is necessary. Future
2 studies of the molecular mechanisms that regulate *GALNT9* expression, as well as
3 enzyme acceptor substrate identification, will contribute to our understanding of
4 neuroblastoma biology.

6 **ACKNOWLEDGEMENTS**

7 This work was supported by *Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer* (Montevideo,
8 Uruguay), *Programme Hospitalier de Recherche Clinique AO MO 2112, Fédération “Enfants*
9 *& Santé”*, *Société Française des Cancers de l’Enfant*, *La Ligue contre le Cancer*. We thank
10 French surgeons and oncologists for providing material and clinical reports and Sabrina Cantais
11 for technical assistance.

12 Edited by *English Booster*, Ltd: www.englishbooster.com

REFERENCES

- Ara T, DeClerck YA (2006) Mechanisms of invasion and metastasis in human neuroblastoma. *Cancer Metastasis Rev* 25:645-657, doi:10.1007/s10555-006-9028-9
- Berois N, Blanc E, Ripoché H, Mergui X, Trajtenberg F, Cantais S, Barrois M, Dessen P, Kågedal B, Bénard J, Osinaga E, Raguénez G (2006a) ppGalNAc-T13: a new molecular marker of bone marrow involvement in neuroblastoma. *Clin Chem* 52:1701-1712, doi:10.1373/clinchem.2006.067975
- Berois N, Mazal D, Ubillos L, Trajtenberg F, Nicolas A, Sastre-Garau X, Magdelenat H, Osinaga E (2006b) UDP-N-Acetyl-D-Galactosamine: Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase-6 as a new immunohistochemical breast cancer marker. *J Histochem Cytochem* 54:317-328, doi:10.1369/jhc.5A6783.2005
- Biedler JL, Spengler BA, Chang TC, Ross RA (1988) Transdifferentiation of human neuroblastoma cells results in coordinate loss of neuronal and malignant properties. *Prog Clin Biol Res* 271:265-276
- Blanc E, Goldschneider D, Ferrandis E, Barrois M, Le Roux G, Leonce S, Douc-Rasy S, Bénard J, Raguénez G (2003) MYCN enhances P-gp/MDR1 gene expression in the human metastatic neuroblastoma IGR-N-91 model. *Am J Pathol* 163:321-331
- Brockhausen I (2006) Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Rep* 7:599-604, doi: 10.1038/sj.embor.7400705

Cheng L, Tachibana K, Iwasaki H, Kameyama A, Zhang Y, Kubota T, Hiruma T, Tachibana K, Kudo T, Guo JM, Narimatsu H (2004) Characterization of a novel human UDP-GalNAc transferase, pp-GalNAc-T15. *FEBS Lett* 566:17-24, doi:10.1016/j.febslet.2004.03.108

Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, Biedler JL, Ross RA (1989) Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res* 49:219-225

Dube DH, Bertozzi CR (2005) Glycans in cancer and inflammation-potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov* 4:477-488, doi:10.1038/nrd1751

Ferrandis E, Da Silva J, Riou G, Bénard J (1994) Coactivation of the MDR1 and MYCN in human neuroblastoma during the metastatic process in the nude mouse. *Cancer Res* 54:2256-2261

Freire T, Berois N, Sónora C, Varangot M, Barrios E, Osinaga E (2006) UDP- N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 (ppGalNAc-T6) mRNA as a potential new marker for detection of bone marrow-disseminated breast cancer cells. *Int J Cancer* 119:1383-1388, doi:10.1002/ijc.21959

Hanisch F (2001) O-glycosylation of the mucin type. *Biol Chem* 382:143-149, doi: 10.1515/BC.2001.022

1
2 Hettmer S, Malott C, Woods W, Ladisch S, Kaucic K (2003) Biological stratification of
3 human neuroblastoma by complex “B” pathway ganglioside expression. *Cancer Res*
4 63:7270-7276

5
6 Hopkins-Donaldson S, Bodmer JL, Bourlout KB, Brognara CB, Tschopp J, Gross N
7 (2000) Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells
8 correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-
9 induced apoptosis. *Cancer Res* 60:4315-4319

10
11 Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Michels E, Mosseri V, Ribeiro A, Lequin D,
12 Vermeulen J, Couturier J, Peuchmaur M, Valent A, Plantaz D, Rubie H, Valteau-
13 Couanet D, Thomas C, Combaret V, Rousseau R, Eggert A, Michon J, Speleman F,
14 Delattre O (2009) Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J*
15 *Clin Oncol* 27:1026-1033, doi: 10.1200/JCO.2008.16.0630

16
17 Kaucic K, Etue N, LaFleur B, Woods, W, Ladisch, S (2001) Neuroblastomas of infancy
18 exhibit a characteristic ganglioside pattern. *Cancer* 91:785-793, doi: 10.1002/1097-
19 0142(20010215)91:4<785

20
21 Kim S, Chung D (2006) Pediatric solid malignancies: Neuroblastoma and Wilm's
22 tumor. *Surg Clin N Am* 86:469-487, doi:10.1016/j.suc.2005.12.008

Kohsaki T, Nishimori I, Nakayama H, Miyazaki E, Enzan H, Nomoto M, Hollingsworth
 MA, Onishi S (2000) Expression of UDP-GalNAc:polypeptide N-
 acetylgalactosaminyltransferase isozymes T1 and T2 in human colorectal cancer. *J*
Gastroenterol 35:840-848, doi: 10.1007/s005350070021

 Mandel U, Hassan H, Therkildsen MH, Rygaard J, Jakobsen MH, Juhl BR, Dabelsteen
 E, Clausen H (1999) Expression of polypeptide GalNAc-transferases in stratified
 epithelia and squamous cell carcinomas: immunohistological evaluation using
 monoclonal antibodies to three members of the GalNAc-transferase family.
Glycobiology 9:43-52, doi:10.1093/glycob/9.1.43

 Maris J (2005) The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk
 stratification. *Cur Opin Pediatrics* 17:7-13

 Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL (2007) Neuroblastoma. *Lancet* 369:2106-
 20, doi:10.1016/S0140-6736(07)60983-0

 Miyahara N, Shoda J, Kawamoto T, Furukawa M, Ueda T, Todoroki T, Tanaka N,
 Matsuo K, Yamada Y, Kohno K, Irimura T (2004) Expression of UDP-N-acetyl-alpha-
 D-galactosamine-polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase isozyme 3 in the
 subserosal layer correlates with postsurgical survival of pathological tumor stage 2
 carcinoma of the gallbladder. *Clin Cancer Res* 10:2090-2099, doi: 10.1158/1078-
 0432.CCR-1024-03

1 Nomoto M, Izumi H, Ise T, Kato K, Takano H, Nagatani G, Shibao K, Ohta R,
 2 Imamura T, Kuwano M, Matsuo K, Yamada Y, Itoh H, Kohno K (1999) Structural basis
 3 for the regulation of UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine: polypeptide N-
 4 acetylgalactosaminyl transferase-3 gene expression in adenocarcinoma cells. *Cancer*
 5 *Res* 59:6214-6222
 6
 7 Patsos G, Hebbe-Viton V, Robbe-Masselot C, Masselot D, San Martin R, Greenwood
 8 R, Paraskeva C, Klein A, Graessmann M, Michalski JC, Gallagher T, Corfield A (2009)
 9 O-glycan inhibitors generate aryl-glycans, induce apoptosis and lead to growth
 10 inhibition in colorectal cancer cell lines. *Glycobiology* 19:382-398,
 11 doi:10.1093/glycob/cwn149
 12
 13 Piacentini M, Piredda L, Starace DT, Annicchiarico-Petruzzelli M, Mattei M, Oliverio
 14 S, Farrace MG, Melino G (1996) Differential growth of N- and S-type human
 15 neuroblastoma cells xenografted into scid mice. correlation with apoptosis. *J Pathol*
 16 180:415-422, doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199612)180:4<415
 17
 18 Pratt M, Hang H, Ten Hagen K, Rarick J, Gerken T, Tabak LA, Bertozzi CR (2004)
 19 Deconvoluting the functions of polypeptide N- α -acetylgalactosaminyltransferase family
 20 members by glycopeptide substrate profiling. *Chem Biology* 11:1009-1016,
 21 doi:10.1016/j.chembiol.2004.05.009
 22
 23 Rajpert-De Meyts E, Poll S, Goukasian I, Jeanneau C, Herlihy A, Bennett EP,
 24 Skakkebaek NE, Clausen H, Giwercman A, Mandel U (2007) Changes in the profile of

1 simple mucin-type O-glycans and polypeptide GalNAc-transferases in human testis and
2 testicular neoplasms are associated with germ cell maturation and tumour
3 differentiation. *Virchows Arch* 451:805-814, doi: 10.1007/s00428-007-0478-4

4
5 Ross RA, Biedler JL, Spengler BA (2003) A role for distinct cell types in determining
6 malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. *Cancer Lett* 197:35-39,
7 doi:10.1016/S0304-3835(03)00079-X

8
9 Shibao K, Izumi H, Nakayama Y, Ohta R, Nagata N, Nomoto M, Matsuo K, Yamada Y,
10 Kitazato K, Itoh H, Kohno K (2002) Expression of UDP-N-acetyl-alpha-D-
11 galactosamine-polypeptide galNAc N-acetylgalactosaminyl transferase-3 in relation to
12 differentiation and prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 94:1939-
13 1946, doi: 10.1002/cncr.10423

14
15 Ten Hagen KG, Fritz TA, Tabak LA (2003) All in the family: the UDP-
16 GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology* 13:1R-16R,
17 doi:10.1093/glycob/cwg007

18
19 Thiele C (1998) Neuroblastoma cell lines. In *Human Cell Culture*, Masters, J (ed) pp
20 21-53. Kluwer Academic Publishers: Lancaster, UK

21
22 Toba S, Tenno M, Konishi M, Mikami T, Itoh N, Kurosaka A (2000) Brain-specific
23 expression of a novel human UDP-GalNAc:polypeptideN-

acetylgalactosaminyltransferase (GalNAc-T9)1 *Biochim Biophys Acta* 1493:264-268,
doi:10.1016/S0167-4781(00)00180-9

Valenzuela HF, Pace KE, Cabrera PV, White R, Porvari K, Kaija H, Vihko P, Baum LG
(2007) O-glycosylation regulates LNCaP prostate cancer cell susceptibility to apoptosis
induced by galectin-1. *Cancer Res* 67:6155-6162

Wagner KW, Punnoose EA, Januario T, Lawrence DA, Pitti RM, Lancaster K, Lee D,
von Goetz M, Yee SF, Totpal K, Huw L, Katta V, Cavet G, Hymowitz SG, Amler L,
Ashkenazi A (2007) Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to
the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat Med* 13:1070-1077, doi:10.1038/nm1627

Wang H, Tachibana K, Zhang Y, Iwasaki H, Kameyama A, Cheng L, Guo J, Hiruma T,
Togayachi A, Kudo T, Kikuchi N, Narimatsu H (2003) Cloning and characterization of
a novel UDPGalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, pp-GalNAc-T14.
Biochem Biophys Res Commun 300:738-744, doi:10.1016/S0006-291X(02)02908-X

Zhang Y, Iwasaki H, Wang H, Kudo T, Kalka T, Hennet T, Kubota T, Cheng L, Inaba
N, Gotoh M, Togayachi A, Guo J, Hisatomi H, Nakajima K, Nishihara S, Nakamura M,
Marth JD, Narimatsu H (2003) Cloning and characterization of a new human UDP-N-
acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase,
designated pp-GalNAc-T13, that is specifically expressed in neurons and synthesizes
GalNAc alpha-serine/threonine antigen. *J Biol Chem* 278:573-584, doi:
10.1074/jbc.M203094200

Table 1 - Clinicopathological characteristics of patients and GALNT9 expression

Patient number	Age (months)	Stage	MYCN	Risk	GALNT9 expression	Survival (months)	Status
1	6	I	N	LRNB	(+)	152	A
2	168	IV	N	HRNB	(-)	81	D
3	1	II	-	LRNB	(+)	12	A
4	2	II	Amp	HRNB	(+)	123	A
5	4	II	Amp	HRNB	(-)	6	D
6	6	III	Amp	HRNB	(+)	120	A
7	3	I	N	LRNB	(+)	37	A
8	13	IV	N	HRNB	(+)	40	A
9	2	II	N	LRNB	(+)	106	A
10	4	II	N	LRNB	(+)	96	A
11	4	IV	N	LRNB	(-)	8	D
12	180	IV	Amp	HRNB	(-)	9	D
13	18	I	N	LRNB	(+)	56	A
14	1	III	N	LRNB	(+)	39	A
15	14	III	N	LRNB	(+)	57	A
16	6	II	N	LRNB	(+)	95	A
17	7	I	N	LRNB	(+)	74	A
18	24	III	Amp	HRNB	(-)	19	D
19	1	II	N	LRNB	(+)	83	A
20	84	IV	N	HRNB	(+)	18	D
21	24	II	N	LRNB	(+)	65	A
22	12	IV	N	LRNB	(-)	67	A
23	5	I	N	LRNB	(+)	42	A
24	1	IV	N	LRNB	(+)	32	A
25	36	IV	N	HRNB	(-)	1	D
26	72	IV	N	HRNB	(-)	75	A
27	300	IV	N	HRNB	(-)	7	D
28	30	IV	N	HRNB	(-)	15	D
29	72	III	Amp	HRNB	(-)	6	D
30	42	IV	N	HRNB	(-)	8	D
31	22	IV	Amp	HRNB	(+)	20	A
32	60	IV	N	HRNB	(-)	13	D
33	6	IV	N	LRNB	(+)	41	A

A: alive; Amp: amplified; D: dead; HRNB: high risk neuroblastoma; LRNB: low risk neuroblastoma; N: normal;

Table 2 – *GALNT* gene expression in human neuroblastoma cell lines

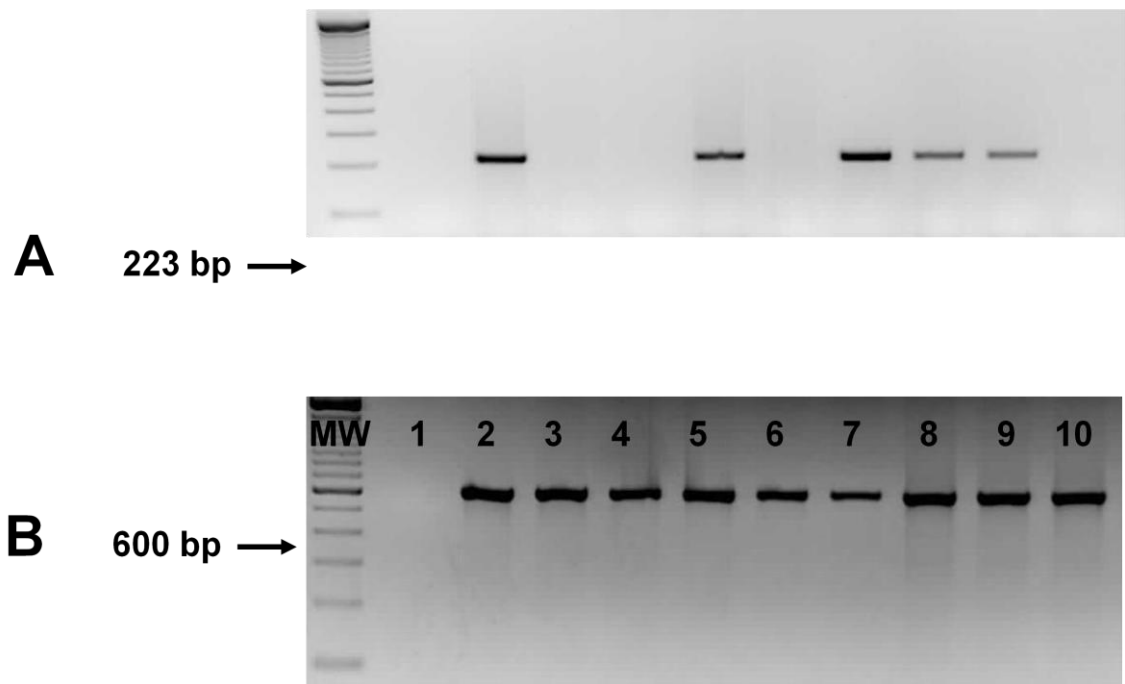
Cell line	GALNT gene expression													
	T1	T2	T3	T4	T6	T7	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	
PTX	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	
BM	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	
IMR-32	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	
SH-SY5Y	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	
LAN-1	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	
LAN-5	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	
SK-N-AS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SK-N-BE(2)	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	

* A very faint band was observed

Table 3 - Clinical outcome of low risk neuroblastoma (LRNB) and high risk neuroblastoma (HRNB) patients in relation to *GALNT9* expression

	GALNT9 (+) (n=20)		GALNT9 (-) (n=13)	
	Alive	Dead	Alive	Dead
LRNB (n = 17)	15/15 (100%)	0/15	1/2 (50%)	1/2 (50%)
HRNB (n = 16)	4/5 (80%)	1/5 (20%)	1/11 (9%)	10/11 (91%)

1



2

3 **Figure 1. Representative results of *GALNT* RT-PCR in neuroblastoma cell lines**
 4 **and primary tumors.**

5 a: RT-PCR for *GALNT9*; b: RT-PCR for *GALNT11*; c: RT-PCR for *GALNT13*, d: RT-
 6 PCR for *GALNT15*.

7 (MW) Molecular weight marker (100 bp), (1) Negative control, (2) IGR-N-91 cell line,

8 (3) PTX cell line, (4) BM cell line, (5) IMR 32 cell line, (6) SH-SY5Y cell line, (7) SK-

9 N-AS cell line, (8) SK-N-BE(2) cell line, (9) LAN1 cell line, (10) LAN5 cell line, (11)

10 neuroblastoma primary tumor 1, (12) neuroblastoma primary tumor 2.

11

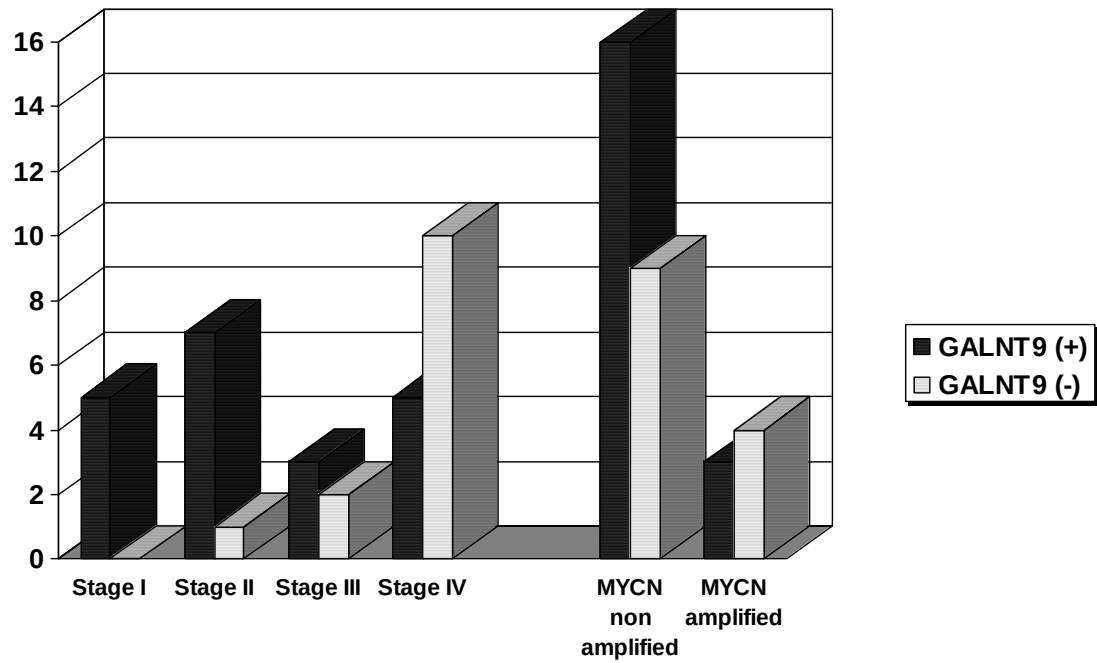
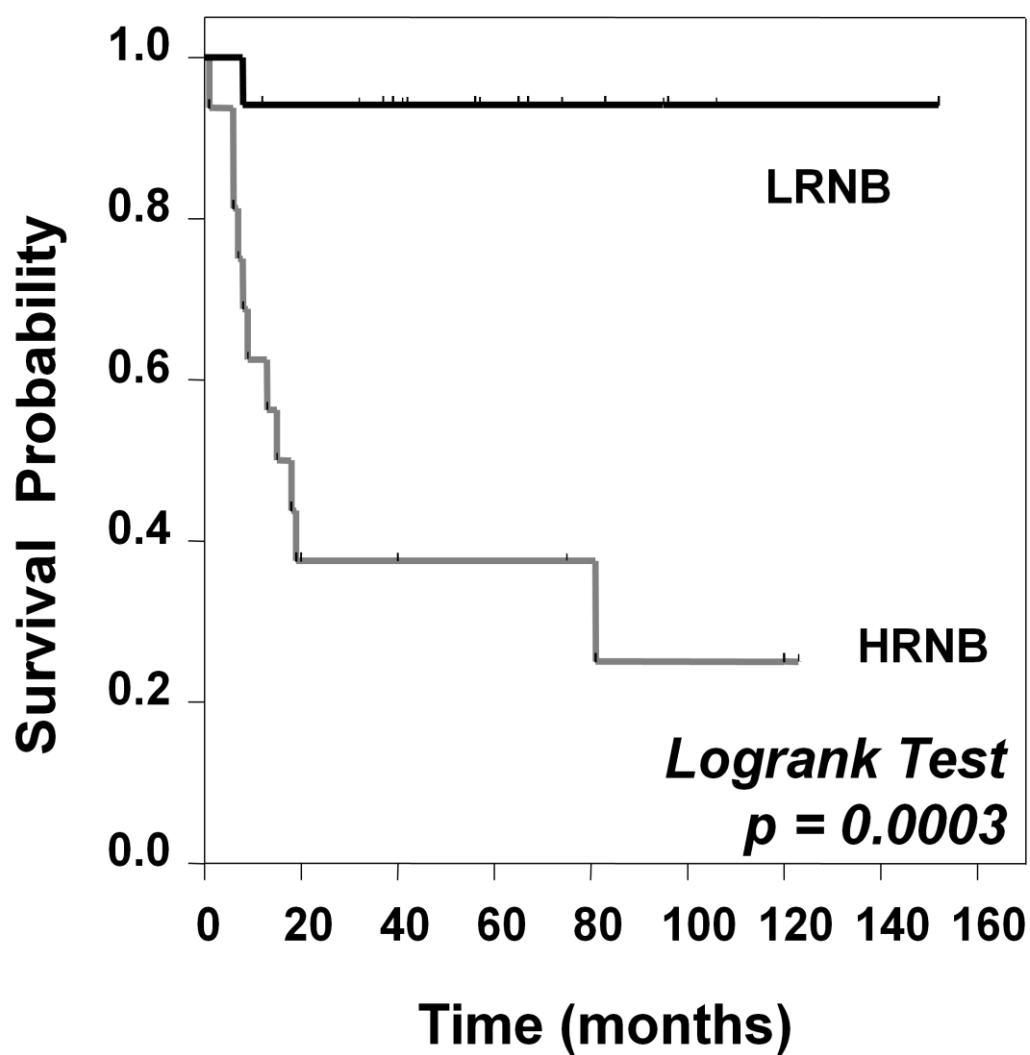


Figure 2. *GALNT9* expression related to stage and *MYCN* status.

Stage I (n = 5), Stage II (n = 8), Stage III (n = 5), Stage IV (n = 15); *MYCN* non amplified (n=25), *MYCN* amplified (n = 7)

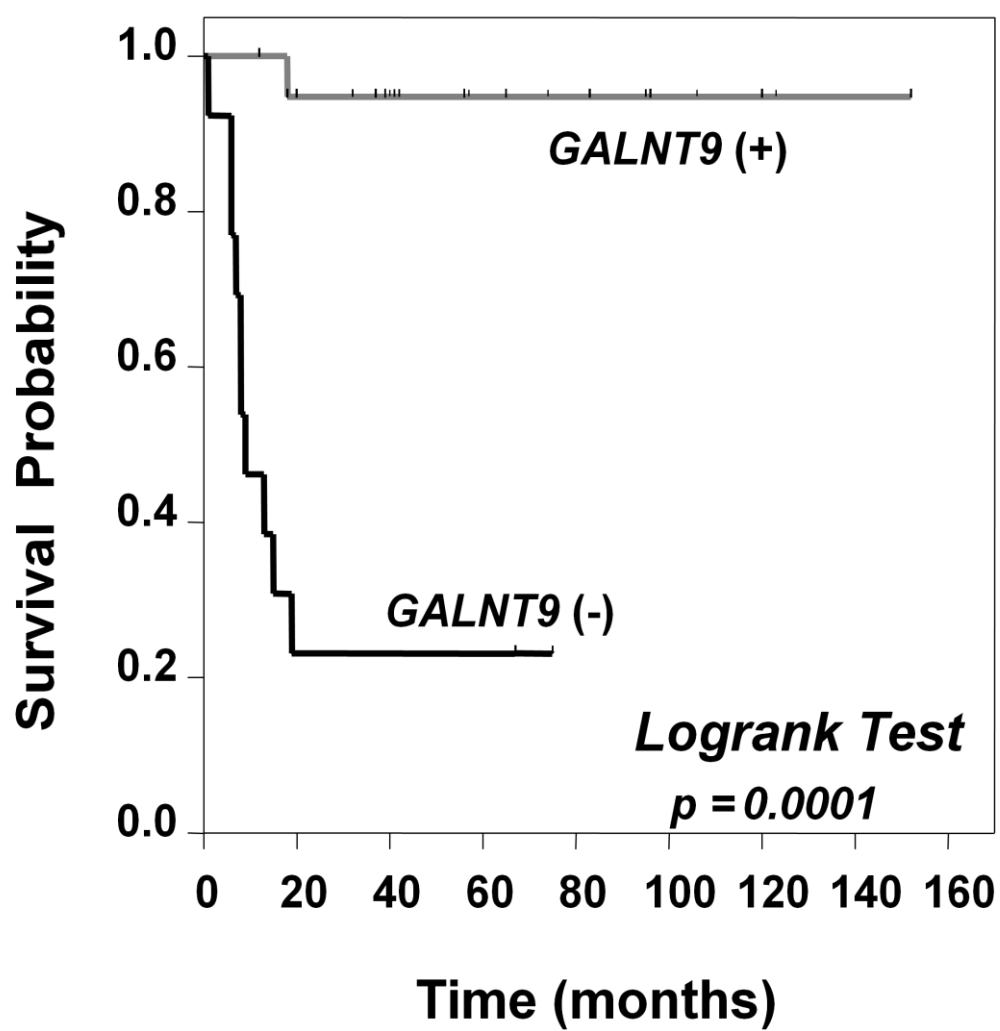
A



1

2

B



C

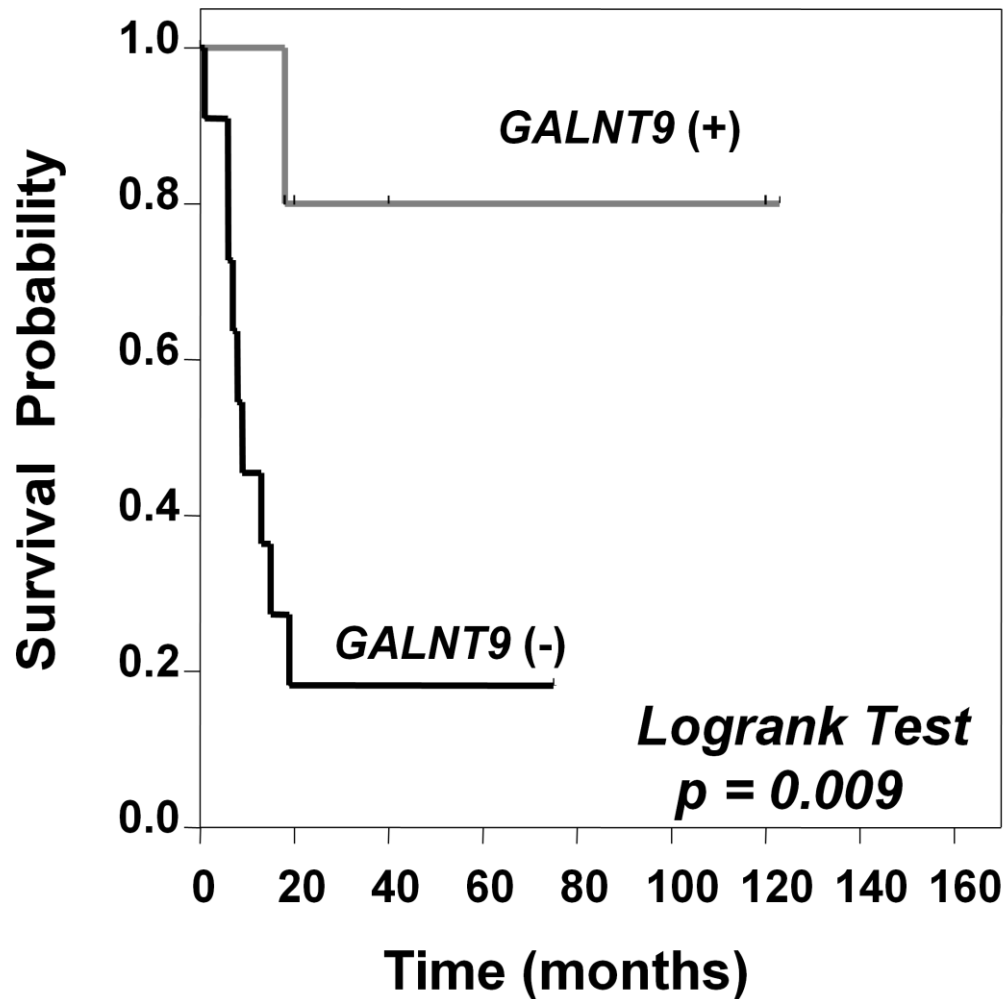


Figure 3. Kaplan-Meier analysis for overall survival of neuroblastoma patients.

(A) According to prognostic risk factor (n = 33), high risk neuroblastoma (HRNB) (n = 16) and low risk neuroblastoma (LRNB) (n = 17). (B) According to *GALNT9* expression in primary tumors in all patients evaluated (n = 33), *GALNT9* expressed (+) (n = 20) and *GALNT9* non-expressed (-) (n = 13). (C) According to *GALNT9* expression in primary tumors in the high risk neuroblastoma (HRNB) group (n = 16), *GALNT9* expressed (+) (n = 5) and *GALNT9* non-expressed (-) (n = 11).