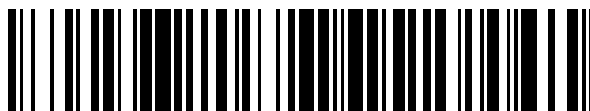


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 770**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/48 (2006.01)

C12N 15/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.1999** **E 10185650 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016** **EP 2357255**

54 Título: **Ensayo para la metilación en el gen para la GST-Pi**

30 Prioridad:

23.04.1998 AU PP312998

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.05.2016

73 Titular/es:

**COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL
RESEARCH ORGANISATION (100.0%)
Limestone Avenue
Campbell, ACT 2601, AU**

72 Inventor/es:

**CLARK, SUSAN JOY;
MILLAR, DOUGLAS S. y
MOLLOY, PETER LAURENCE**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 568 770 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo para la metilación en el gen para la GST-Pi

Campo de la invención:

5 Esta invención se refiere a un ensayo para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad o afección caracterizado por la metilación anormal de la citosina en un sitio o sitios dentro del gen para la glutatión S-transferasa (GST) Pi y/o sus secuencias de flanqueo reguladoras. En una aplicación particular, la invención proporciona un ensayo para el diagnóstico o pronóstico de cáncer de próstata.

Antecedentes de la invención:

Metilación del ADN en genomas de mamíferos

10 La única modificación post-sintética establecida del ADN en genomas de animales y plantas superiores es la metilación de la posición 5' de la citosina. La proporción de citosinas que son metiladas puede variar desde un pequeño porcentaje en algunos genomas de animales (1) hasta 30% en algunos genomas de plantas (2). Gran parte de esta metilación se encuentra en los sitios CpG en donde las citosinas simétricamente posicionadas en cada hebra son metiladas. En los
15 genomas de plantas, la metilación simétrica similar de citosinas en CpNpG (donde N puede ser cualquier base) también es común (3). Tales sitios de metilación también se han identificado con baja frecuencia en el ADN de mamífero (4).

Los patrones de metilación son heredables ya que la enzima metilasa reconoce como sustrato, sitios donde un dinucleótido CpG está metilado en una hebra, pero la C correspondiente en la otra hebra no está metilada, y procede a metilarla (5, 6). Los sitios completamente no metilados normalmente no actúan como sustratos para la enzima y por lo tanto permanecen no metilados a través de sucesivas divisiones celulares. Por lo tanto, en ausencia de errores o
20 eventos intervinientes específicos, la enzima metilasa permite la heredabilidad estable de los patrones de metilación.

Amplios estudios de expresión génica en vertebrados han demostrado una fuerte correlación entre la metilación de regiones reguladoras de los genes y su falta de expresión (7). La mayoría de estos estudios han examinado sólo un número limitado de sitios de enzimas de restricción usando enzimas que no logran hacer el corte si están metilados sus
25 sitios objetivo. Un número mucho más limitado han sido examinados en todas las bases de citosina utilizando métodos de secuenciación genómica (8, 9).

Conversión de ADN con bisulfito

El tratamiento de ADN monocatenario con altas concentraciones de bisulfito seguido por álcali conduce a la desaminación selectiva de la citosina, convirtiéndola en uracilo (10, 11). Por el contrario, las 5-metil citosinas (5meC) son resistentes a esta desaminación química. Cuando el ADN tratado con bisulfito es copiado por ADN polimerasas, los
30 uracilos se leen como si fueran timinas y un nucleótido de adenina incorporado, mientras que 5meC todavía se lee como una citosina (siendo G incorporada en frente). Por lo tanto, después de que se amplifica una región de secuencia por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las citosinas en la secuencia que fueron metiladas en el ADN original se leerán como citosinas mientras que las citosinas no metiladas se leerán como timinas (12, 13).

Amplificación por PCR de ADN metilado y no metilado

35 Con el fin de amplificar el ADN tratado con bisulfito, se diseñan los cebadores para hibridarse con la secuencia producida después del tratamiento con bisulfito del ADN. Dado que las citosinas se convierten en uracilos, la base en el cebador de hibridación será una adenina en lugar de una guanina para la citosina no convertida. Del mismo modo, para el otro cebador del par, timinas reemplazan citosinas. Para permitir la cuantificación de los niveles de metilación en el ADN objetivo, normalmente se escogen los cebadores para evitar los sitios que pueden o no ser metilados (en particular
40 los sitios CpG) y entonces pueden contener ya sea un 5meC o un uracilo después del tratamiento con bisulfito. El uso de tales cebadores no selectivos permite amplificar tanto los ADN metilados como los no metilados por PCR, permitiendo la cuantificación del nivel de metilación en la población de partida de ADN. El ADN amplificado por PCR se puede cortar con una enzima de restricción informativa, se puede secuenciar directamente para proporcionar una medida promedio de la proporción de metilación en cualquier posición o se pueden clonar y secuenciar moléculas (cada
45 clon se deriva de la amplificación de una hebra individual en el ADN inicial). Tales estudios han indicado que, aunque una población de moléculas puede ajustarse a un patrón general de metilación, no todas las moléculas serán idénticas y la metilación pueden encontrarse en sólo una fracción de las moléculas en algunos sitios (13, 16).

Amplificación selectiva de ADN metilado

50 Recientemente, Herman et al. (14) describieron una variación del procedimiento de secuenciación con bisulfito para hacerlo selectivo para la amplificación de ADN metilado solamente. En este trabajo, se utilizaron cebadores de PCR que

fueron diseñados para discriminar entre las secuencias producidas después del tratamiento con bisulfito de los ADN objetivo metilados y no metilados. Por lo tanto, las citosinas que formaban parte de un sitio CpG no serían convertidas con bisulfito y se mantendrían como citosinas en el ADN metilado pero se convertirían en uracilos en el ADN objetivo no metilado. Los cebadores que utilizan estas diferencias fueron diseñados y utilizados para la amplificación de secuencias de ADN metilado de cuatro genes supresores tumorales, cuatro p16, p15, E-cadherina y von Hippel-Lindau.

Metilación del gen para glutatión S-transferasa pi en cáncer de próstata

Lee et al. (15) (patente de los Estados Unidos No 5.552.277 y la solicitud internacional de patente No PCT/US95/09050) demostraron que la expresión del gen para la glutatión S-transferasa (GST) Pi se pierde en casi todos los casos de cáncer de próstata. Ellos mostraron, además, que en veinte casos examinados, utilizando transferencia tipo Southern, que esta pérdida de expresión estaba acompañada por metilación en un sitio específico de la enzima de restricción (BssHII) en la región promotora del gen. Esta metilación no se observó en tejido prostático normal o en un gran número de otros tejidos normales examinados. En el examen de una línea celular de cáncer de próstata en la que el gen para la GST-Pi está inactivo, también identificaron metilación en otros dos sitios de enzimas de restricción, *NotI* y *SacII* en la región promotora del gen. La digestión de los ADN de la línea celular con las enzimas *MspI* y *HpaII*, indicó que la correlación de la metilación del ADN con la falta de expresión no se mantuvo para estos sitios que se encuentran en gran parte secuencia abajo del sitio de inicio de la transcripción. La naturaleza de los datos hace que sea difícil llegar a conclusiones sobre el estado de metilación de sitios individuales de *MspI/HpaII*. Sin embargo, Lee et al. (18) fueron capaces de demostrar que después de la digestión con *HpaII* (que cortará en todos los sitios no metilados de *HpaII*), una región de ADN que contiene doce sitios de reconocimiento de *HpaII* podría ser amplificada por PCR a partir de ADN del tumor, pero no de próstata normal o ADN de leucocitos. Esto indica que algunas moléculas de ADN en el cáncer de próstata están metiladas en todos estos sitios de *HpaII*, mientras que los ADN de próstata normal y el ADN de leucocitos deben contener al menos uno de estos sitios no metilados (ya que un solo corte hará que la región no pueda ser amplificada por PCR).

Los presentes inventores han identificado y desarrollado un método alternativo para la detección de sitios de metilación presentes en el ADN de tejido de cáncer de próstata, pero no presentes en el ADN de tejido normal. El método se basa en la amplificación selectiva de una región objetivo del gen para la GST-Pi pero no requiere restricción previa con una enzima de restricción informativa.

Divulgación de la invención:

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un ensayo de diagnóstico o pronóstico para cáncer de próstata en un sujeto, dicho cáncer de próstata caracterizado por metilación anormal de la citosina en el sitio +2 dentro del gen para glutatión S-transferasa (GST) Pi humana y/o sus secuencias de flanco reguladoras, en donde dicho ensayo comprende las etapas de:

(i) aislar el ADN de dicho sujeto,

(ii) exponer dicho ADN aislado a los reactivos y condiciones para la amplificación de una región objetivo del gen para la GST-Pi humana, que incluye dicho sitio, siendo la amplificación selectiva porque sólo se amplifica la región objetivo si dicho sitio o sitios en los que se produce metilación anormal de citosina está/están metilados, y

(iii) determinar la presencia de ADN amplificado.

Dado que la amplificación está diseñada solamente para amplificar la región objetivo si dicho sitio o sitios en el cual ocurre la metilación anormal de citosina (es decir, en comparación con el sitio o sitios correspondientes de ADN de sujetos sin la enfermedad o condición que se está analizando) está / están metilados, la presencia de ADN amplificado será indicativa de la enfermedad o afección en el sujeto del que se ha obtenido el ADN aislado. El ensayo proporciona por lo tanto un medio para diagnosticar o pronosticar la enfermedad o afección en un sujeto.

La etapa de aislamiento del ADN puede llevarse a cabo de acuerdo con protocolos estándar. El ADN puede ser aislado de cualquier muestra corporal adecuada, tal como células de tejido (muestras frescas o fijadas), sangre (incluyendo suero y plasma), semen, orina, linfa o médula ósea. Para algunos tipos de muestras corporales, en particular muestras de fluidos tales como sangre, semen, orina y linfa, puede ser preferible someter en primer lugar la muestra a un proceso para enriquecer la concentración de un determinado tipo de células (por ejemplo, células de próstata). Un proceso adecuado para el enriquecimiento implica la separación de las células requeridas mediante el uso de anticuerpos específicos de las células acoplados a perlas magnéticas y un dispositivo magnético de separación de las células.

Antes de la etapa de amplificación, el ADN aislado se trata preferiblemente de tal manera que las citosinas no metiladas se convierten en uracilo u otro nucleótido capaz de formar un par de bases con la adenina, mientras que las citosinas metiladas permanecen inalteradas o se convierten en un nucleótido capaz de formar un par de bases con la guanina.

Este tratamiento permite el diseño de cebadores que permiten la amplificación selectiva de la región objetivo si dicho sitio o sitios en los que se produce la metilación de la citosina anormal está/están metilado(s).

Preferiblemente, después del tratamiento y la amplificación del ADN aislado, se realiza una prueba para verificar que las citosinas no metiladas han sido convertidas de manera eficiente en uracilo u otro nucleótido capaz de formar un par de bases con la adenina, y que las citosinas metiladas han permanecido sin cambios o han sido eficientemente convertidas en otro nucleótido capaz de formar un par de bases con la guanina.

Preferiblemente, el tratamiento del ADN aislado implica la reacción del ADN aislado con bisulfito de acuerdo con protocolos estándar. Como será evidente a partir de la discusión anterior del tratamiento con bisulfito, las citosinas no metiladas se convertirán en uracilo mientras que las citosinas metiladas permanecerán sin cambios. La verificación de que las citosinas no metiladas se han convertido en uracilo y que las citosinas metiladas han permanecido sin cambios puede conseguirse mediante:

(i) la restricción de una parte alícuota del ADN tratado y amplificado con una(s) enzima(s) de restricción adecuada(s) que reconocen un(os) sitio(s) de restricción generado(s) por o resistente(s) al tratamiento con bisulfito, y

(ii) la evaluación del patrón del fragmento de restricción por electroforesis. Alternativamente, la verificación puede lograrse mediante hibridación diferencial usando oligonucleótidos específicos dirigidos a las regiones del ADN tratado donde las citosinas no metiladas se habrían convertido en uracilo y las citosinas metiladas habrían permanecido sin cambios.

La etapa de amplificación puede implicar la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la amplificación mediante la reacción en cadena de la ligasa (20) y otras (21).

Preferiblemente, la etapa de amplificación se lleva a cabo de acuerdo con protocolos estándar para la amplificación por PCR, en cuyo caso, los reactivos serán típicamente cebadores adecuados, dNTP y una ADN polimerasa termoestable, y las condiciones serán ciclos de temperaturas y duraciones variables para efectuar la desnaturalización alternante de dúplex de hebras, hibridación de cebadores (por ejemplo, bajo condiciones de alta rigurosidad) y posterior síntesis de ADN.

Para lograr la amplificación selectiva por PCR con ADN tratado con bisulfito, se pueden utilizar cebadores y condiciones para discriminar entre una región objetivo que incluye un sitio o sitios de metilación anormal de citosina y una región objetivo donde no hay sitio o sitios de metilación anormal de citosina. Así, para amplificación solamente de una región objetivo en donde dicho sitio o sitios en donde ocurre la metilación anormal de citosina está/están metilados, los cebadores utilizados para hibridar con el ADN tratado con bisulfito (es decir, cebadores inversos) incluirán un(os) nucleótido(s) de guanina en un(os) sitio(s) en el que(los que) se formará(n) un par de bases con una(s) citosina(s) metilada(s). Tales cebadores formarán una falta de coincidencia si la región objetivo en el ADN aislado tiene nucleótido(s) de citosina no metilado(s) (que habrían sido convertidos en uracilo por el tratamiento con bisulfito) en el sitio o sitios en los que se produce la metilación anormal de citosina. Los cebadores utilizados para la hibridación con la hebra opuesta (es decir, los cebadores directos) incluirán un(os) nucleótido(s) de citosina en cualquier sitio(s) que corresponde(n) al(los) sitio(s) de citosina metilada en el ADN tratado con bisulfito.

Preferiblemente, los cebadores utilizados para la amplificación por PCR son de 12 a 30 nucleótidos de longitud y están diseñados para hibridarse con una secuencia dentro de la región objetivo que incluye dos a cuatro nucleótidos de citosina que están metilados anormalmente en el ADN de un sujeto con la enfermedad o condición que está siendo analizada. Además, los cebadores incluyen preferiblemente un nucleótido terminal que formará un par de bases con un nucleótido de citosina (cebador inverso), o el nucleótido opuesto de guanina (cebador directo), que está anormalmente metilado en el ADN de un sujeto con la enfermedad o condición que se está analizando.

La etapa de amplificación se utiliza para amplificar una región objetivo dentro del gen para la GST-Pi y/o sus secuencias de flaqueo reguladoras. Las secuencias flanqueadoras reguladoras pueden ser consideradas como las secuencias de flaqueo 5' y 3' del gen para la GST-Pi, que incluyen los elementos que regulan, ya sea solos o en combinación con otro elemento similar, la expresión del gen para la GST-Pi. Preferiblemente, las secuencias flanqueadoras reguladoras consisten de la secuencia de 400 nucleótidos inmediatamente 5' del sitio de inicio de la transcripción y la secuencia de 100 nucleótidos inmediatamente 3' del sitio de detención de la transcripción.

Más preferiblemente, la etapa de amplificación se utiliza para amplificar una región objetivo dentro de la región del gen para la GST-Pi y sus secuencias flanqueadoras reguladoras definidas por (e inclusivas de) sitios CpG -43 a +55 (en donde la numeración de los sitios CpG es relativa al sitio de inicio de la transcripción). La numeración y la posición de los sitios CpG se muestran en la Figura 1.

La etapa de determinación de la presencia de ADN amplificado puede llevarse a cabo de acuerdo con protocolos estándar. Un método conveniente implica la visualización de una(s) banda(s) que corresponde(n) a ADN amplificado, después de la electroforesis en gel.

Para el diagnóstico o pronóstico de cáncer de próstata, la etapa de amplificación amplifica preferiblemente una región objetivo dentro de la región del gen para la GST-Pi y sus secuencias flanqueadoras reguladoras definidas por (e inclusive de) sitios CpG -43 a +53, más preferiblemente, -43 a +10. Sin embargo, dentro de estas regiones objetivo se cree que hay sitios CpG que muestran variabilidad en estado de metilación en cáncer de próstata o están metilados en otros tejidos. Por lo tanto, para la región objetivo definida por (e inclusive de) sitios CPG, -48 a +10, se prefiere que los cebadores utilizados para la amplificación se diseñen para reducir al mínimo (es decir, mediante el uso de cebadores redundantes o evitando los sitios) la influencia de sitios CpG -36, -32, -23, -20, -14 y un sitio que cubre la región polimórfica -33. Además, para el ADN aislado de células que no sean de tejido de la próstata (por ejemplo, sangre), se prefiere que los cebadores usados se diseñen para amplificar una región objetivo que no incluya la región del gen para a GST-Pi y sus secuencias flanqueadoras reguladoras definidas por (e inclusivas de) sitios CpG -7 a +7, o, más preferiblemente, -13 a +8, ya que esto puede dar lugar a **falsos positivos**. Las regiones objetivo preferidas adicionales, por lo tanto, están dentro de la región del gen para la GST-Pi y sus secuencias flanqueadoras reguladoras definidas por (e inclusive de) los sitios CpG -43 a -14, -43 a -8, +9 a +53 y +1 a +53.

Los pares de cebadores adecuados para el diagnóstico o pronóstico de cáncer de próstata, incluyen aquellos que consisten de un cebador directo y uno inverso seleccionados de cada uno de los siguientes grupos:

Cebadores directos (es decir, que hibridan con el extremo 5' de la región objetivo)

CGCGAGGTTTTCGTTGGAGTTTCGTCGTC (SEQ ID NO: 1)

Cebadores inversos (es decir, que hibridan con la extensión del cebador directo)

TCCCATCCCTCCCCGAAACGCTCCG (SEQ ID NO: 8)

Se apreciará por parte de las personas expertas en la técnica, que un sitio o sitios de metilación anormal de citosina dentro de las regiones objetivo anteriormente identificadas del gen para la GST-Pi y/o sus secuencias flanqueadoras reguladoras, podrían ser detectados para los fines de diagnóstico o pronóstico de una enfermedad o condición (en particular, cáncer de próstata y/o cáncer de hígado) por métodos que no implican una amplificación selectiva. Por ejemplo, las sondas de oligonucleótido/polinucleótido podrían ser diseñadas para uso en estudios de hibridación (por ejemplo, transferencia tipo Southern) con DNA tratado con bisulfito que, en condiciones apropiadas de rigurosidad, se hibridan selectivamente sólo con DNA que incluye un sitio o sitios de metilación anormal de citosina(s). Alternativamente, una enzima(s) de restricción informativa apropiadamente seleccionada(s) podría(n) ser utilizada(s) para producir patrones de fragmentos de restricción que distinguen entre el ADN que incluye y que no incluye un sitio o sitios de metilación anormal de citosina(s).

Por lo tanto, en un segundo aspecto, la presente invención proporciona un ensayo de diagnóstico o pronóstico para cáncer de próstata en un sujeto, dicho cáncer de próstata caracterizado por metilación anormal de la citosina en el sitio +2 dentro del gen para la glutatión S-transferasa humana (GST) Pi y/o sus secuencias flanqueadoras reguladoras, en donde dicho análisis comprende las etapas de:

(i) aislar el ADN de dicho sujeto, y

(ii) determinar la presencia de metilación anormal de citosina en dicho sitio o sitios dentro de la región del gen para la GST-Pi humana definido por (e inclusive de) los sitios CpG -43 a +55.

La etapa de aislamiento de ADN puede llevarse a cabo como se describió anteriormente en relación con el ensayo del primer aspecto.

Preferiblemente, la región del gen para la GST-Pi y sus secuencias flanqueadoras reguladoras dentro de las cuales se determina la presencia de citosina(s) metilada(s) en un sitio o sitios se selecciona de entre las regiones definidas por (e inclusivas de) los sitios CpG -43 a +53, -43 a +10, -43 a -14, +9 a +53 y +1 a +53. Sin embargo, dentro de estas regiones, se prefiere que ciertos sitios (es decir, sitios CpG, -36, -33, -32, -23, -20, -17 y -14) sean evitados ya que el sitio o sitios en los que, por el propósito del ensayo, se determina la presencia de metilación anormal de citosina.

Cuando la etapa de determinación implica la hibridación selectiva de sondas de oligonucleótido/polinucleótido/ácido péptido-nucleico (PNA), antes de la etapa de determinación, se trata el ADN aislado preferiblemente (por ejemplo, con bisulfito) de tal manera que las citosinas no metiladas se convierten en uracilo o 10 otros nucleótido capaz de formar un par de bases con la adenina, mientras que las citosinas metiladas permanecen inalteradas o se convierten a un

nucleótido capaz de formar un par de bases con la guanina. Este tratamiento permite el diseño de sondas que permiten la hibridación selectiva con una región objetivo que incluye un sitio o sitios de metilación anormal de citosina.

En un tercer aspecto, la presente descripción divulga un cebador o una sonda (secuencia mostrada en la dirección 5' a 3') que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de:

5 CGCGAGGTTTTCTGTTGGAGTTTCGTCGTC (SEQ ID NO: 1)

AAAAATTCRAATCTCTCCGAATAAACG (SEQ ID NO: 8)

10 Los términos "comprenden", "comprende" y "que comprende" como se usan en toda la memoria descriptiva pretenden referirse a la inclusión de un componente indicado, característica o etapa o grupo de componentes, características o etapas con o sin la inclusión de un componente adicional, característica o etapa o grupo de 10 componentes, características o etapas.

La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a las figuras acompañantes y los siguientes ejemplos no limitantes.

Breve descripción de las figuras acompañantes:

15 La Figura 1 muestra la organización y secuencia de nucleótidos del gen para la GST-pi humana. Los sitios CpG están numerados en relación con el sitio de inicio de la transcripción. La numeración de la secuencia de nucleótidos está de acuerdo con la secuencia del gen para la GST-Pi del GenBank, acceso No. M24485.

20 La Figura 2 muestra la región del gen para la GST-Pi que exhibe metilación diferencial en el cáncer de próstata. La figura muestra además la secuencia y la derivación de cebadores para la región secuencia arriba (desde el sitio CpG -43 a +10) y el polimorfismo común que abarca el sitio CpG -33 (que se muestra encima de la secuencia (p)). Debajo de la secuencia de GST-Pi se muestra la secuencia de la hebra derivada después de la conversión de las citosinas en uracilo. La hebra derivada se muestra ya sea asumiendo que todos los CpG están metilados (B-M) o no-metilados (B-U). Por debajo de esta se muestran cebadores específicos diseñados para amplificar selectivamente la secuencia metilada.

La Figura 3 muestra el estado de metilación de cada sitio CpG en ADN aislados;

25 A - para la región promotora central a través del extremo 3' del gen para la GST-Pi para la línea celular LNCaP (LN), la línea celular DU145 (DU), la línea celular PC3, la línea celular PC3-M y la línea celular PC3-MM, para el ADN aislado a partir de muestras de tejido normal de pacientes con cáncer de próstata (2AN, BN y CN), para tejido tumoral de próstata (BC, CC, DC, XC, WC y 2AC) y para tejido normal de la próstata (Pr) de una persona sin cáncer de próstata:

30 B - para la región promotora central y las secuencias en dirección 5' del gen para la GST-Pi a partir de tejido normal de próstata (de una persona sin cáncer de próstata), a partir de tres muestras de cáncer de próstata (BC, CC y DC) y para una cantidad de otros tejidos normales. Los pacientes B y D eran polimórficos en el sitio CpG -33 y el nivel de metilación indicado entre paréntesis refleja la metilación del alelo que contiene el CpG. Para los sitios CpG -28 a +10, el nivel de metilación se determinó mediante análisis directo de la secuencia de la población de moléculas de la PCR (17). Para los sitios CpG secuencia arriba, -56 a -30, se clonaron los productos de la PCR y se secuenciaron una cantidad de clones individuales (número indicado entre paréntesis debajo del nombre de la muestra). Para los tejidos normales el nivel de metilación en cada sitio se determinó como la fracción de todos los clones que contenían una C en esa posición. Para las muestras de cáncer BC, CC y DC, el nivel de metilación que se muestra es aquel entre los clones que mostraron metilación del ADN en la región del sitio CpG -43 a -30 (aproximadamente la mitad de los clones en cada caso).

40 Tanto en A como en B, un cuadro en blanco indica que el sitio no fue ensayado, y una "B" indica que el estado del sitio no se pudo determinar (por ejemplo, debido a un bloqueo de la secuencia o que estaba más allá del rango de la ronda de secuenciación). Se muestra el nivel de metilación detectado en cada sitio, ninguno (-), hasta el 25% (+), de 26 a 50% (++) , de 51 a 75% (+++) y de 76 a 100% (++++). También se muestra el grado de Gleason de las muestras tumorales.

La Figura 4 proporciona los resultados de la amplificación de los ADN tratados con bisulfito de una variedad de tejidos:

45 A - el panel A (región que cubre el sitio de inicio de la transcripción) usó CGPS-1 y 3 como cebadores externos y CGPS-2 y 4 como cebadores internos, el panel B usó el par de cebadores externos CGPS-5 y 8, que abarca la región del sitio CpG -39 a -16 para la primera ronda de amplificación, seguido de una segunda ronda de amplificación con los cebadores CGP-6 y 7, amplificando un fragmento de 140 pb que abarca los sitios CpG -36 a -23. Los carriles son: 1. Cerebro, 2. Pulmones, 3. Músculo esquelético, 4. Bazo, 5. Páncreas, 6. Próstata "normal" de anciano de 85 años, 7.

Próstata "normal" de anciano de 62 años, 8. Corazón, 9. Médula ósea, 10. Sangre-1, 11. Sangre-2, 12. Sangre-3, 13. Hígado-1, 14. Hígado-2;

B – se utilizaron los mismos pares de cebadores que para la amplificación mostrada en la Figura 4A Panel B, con el ADN de 10 muestras de tejido canceroso de próstata (c) y muestras de tejido normal (n) emparejadas de las mismas próstatas (también se muestran ADN de LNCaP como control positivo (+) y un control negativo (-). Debajo está el grado de Gleason y el nivel de metilación de muestras observadas con cebadores no selectivos.

C – se utilizaron los mismos pares de cebadores que para la amplificación mostrada en la Figura 4A Panel B. con el ADN de una gama de tejidos sanos, sangre de pacientes con cáncer de próstata y diversas líneas celulares. Los carriles son: Panel A 1–10 muestras de sangre de pacientes con cáncer de próstata durante prostatectomía radical; Panel B 1. Próstata-1 normal, 2. Próstata-2 normal, 3. Próstata-3 normal, 4. Próstata-4 normal, 5. Próstata-5 normal, 6. Línea celular de próstata transformada con VPH, 7. Sangre de próstata de paciente PA (PSA = 1000), 8. Sangre de próstata de paciente PB (PSA = 56). 9. Sangre de próstata de paciente PC (PSA = 18); y Panel C 1. Línea celular LNCaP, 2. Línea celular Du145, 3. Línea celular PC-3, 4. Línea celular PC-3M, 5. Línea celular PC-3MM. 6. Línea celular Hela, 7. ADN leucémico, 8. Línea celular HepG2, 9. ADN de hígado humano, 10. Glóbulos blancos, 11. Línea celular MRC-5.

La Figura 5 presenta los resultados de la amplificación de los ADN tratados con bisulfito de fluido seminal de pacientes con cáncer de próstata (c) y de hombres no diagnosticados con cáncer de próstata (n), usando el par cebador externo CGPS-5 y 8 y CGPS-6 y 7 como el par de cebadores internos. Los carriles son L. Línea celular LNCaP (control positivo), D. Línea celular DU145, P. Línea celular PC-3 (controles negativos), y M. Marcadores de peso molecular.

La Figura 6 muestra los resultados de la amplificación de los ADN tratados con bisulfito, en donde el ADN ha sido aislado a partir de portaobjetos con tejido de próstata que se había identificado ya sea como canceroso o enfermo con hiperplasia benigna (HPB). La amplificación selectiva por PCR se llevó a cabo usando el par de cebadores exterior CGPS-5 y 8 y el par de cebadores internos CGPS-11 y 12.

La Figura 7 muestra los resultados de la amplificación de los ADN tratados con bisulfito, en donde el ADN ha sido aislado a partir de células de cáncer de próstata enriquecidas a partir de muestras de sangre usando perlas magnéticas recubiertas con un anticuerpo anti-epitelial. Se añadieron diferentes cantidades de células de cáncer de próstata LNCaP a las muestras de sangre (7A) o sangre con células LNCaP añadidas almacenadas durante diferentes períodos de tiempo a 4°C o a temperatura ambiente antes del aislamiento del ADN.

La Figura 8 proporciona los resultados de la amplificación de los ADN tratados con bisulfito, en donde el ADN ha sido aislado de muestras de sangre de sujetos normales con ninguna enfermedad conocida de la próstata, de pacientes con hiperplasia benigna (HPB) de la próstata y de pacientes con diagnóstico histológicamente confirmado de cáncer de próstata.

La Figura 9 muestra los resultados de la amplificación de los ADN tratados con bisulfito aislados a partir de 20 muestras de tejido canceroso de hígado. Se realizó una amplificación selectiva por PCR usando el par de cebadores externos CGPS-5 y 8 y el par de cebadores internos CGPS-11 y 12.

La Figura 10 muestra los resultados de las pruebas realizadas para confirmar que cualquiera de los productos amplificados de ADN ha sido producido a partir de la amplificación del ADN tratado con bisulfito en donde toda la citosina no metilada ha sido convertida en uracilo. Las pruebas se llevaron a cabo utilizando sondas de oligonucleótidos diseñadas para hibridar con regiones objetivo convertidas o no convertidas.

Métodos generales y estrategias

(1) Tratamiento del ADN con bisulfito

Se aisló el ADN para ensayo a partir de fuentes adecuadas mediante protocolos estándar y se lo trató con bisulfito por métodos bien conocidos (12, 13, 16).

(2) Caracterización de la metilación de sitios individuales en el ADN

Con el fin de determinar el estado de metilación de nucleótidos individuales de citosina en los ADN objetivo y no objetivo y para identificar las diferencias entre ellos, se amplificó ADN modificado con bisulfito mediante PCR usando cebadores diseñados para reducir al mínimo la posibilidad de que el estado de metilación de un sitio CpG particular, influya la hibridación del cebador y la posterior amplificación (12, 13, 16).

(3) Diseño de cebadores selectivos

Con base en la información de la secuenciación, se diseñaron cebadores para uso en el ensayo para maximizar la posibilidad de que el estado de metilación de un sitio CpG particular pueda influir en la hibridación del cebador y la posterior amplificación. Específicamente, los principios de diseño seguidos (descritos para el cebador PCR "directo" donde el cebador contiene las mismas conversiones C por T (o U) como ocurriría en el ADN tratado con bisulfito), se enumeran a continuación en (a) hasta (d):

(a) Esos cebadores deben cubrir regiones de secuencias que contienen una cantidad de C. La conversión de las C metiladas en U permite la discriminación entre las moléculas que han sido objeto de conversión eficiente con bisulfito y moléculas en las que las C no han reaccionado (por ejemplo, porque no se disolvieron completamente o que contienen regiones de estructura secundaria).

(b) Que al menos una, pero preferiblemente al menos dos a cuatro, de las C en las regiones deben ser de C (generalmente en los sitios CpG) que se sabe que están metiladas en una alta proporción del ADN que se va a detectar (es decir, ADN objetivo). Por lo tanto, estas C permanecerán como C en el ADN objetivo mientras se convierten en U en el ADN no objetivo. Un cebador que está diseñado para ser el equivalente exacto del ADN metilado convertido con bisulfito contendrá una falta de coincidencia en cada una de las posiciones de una C no metilada que ha sido convertida a una U en un ADN no metilado. Entre más faltas de correspondencia estén presentes, mayor será la estabilidad diferencial de hibridación de los cebadores y por lo tanto mayor la diferencia selectiva en PCR.

(c) Que la base terminal 3' del cebador debe ser preferiblemente una C correspondiente a una C que se sabe que está metilada en el ADN objetivo (normalmente parte de un dinucleótido CpG). El apareamiento correcto con la base terminal del cebador permitirá un cebado altamente selectivo de secuencias objetivo en comparación con secuencias no metiladas de fondo que formarán una falta de correspondencia C:A.

(d) Que en las posiciones donde se sabe que ocurre la metilación en sólo una fracción de las moléculas en el ADN objetivo metilado o donde se sabe que varían entre los ADN objetivo (por ejemplo, en diferentes muestras tumorales), se puede incorporar redundancia en los cebadores para permitir la amplificación ya sea de C o de T del ADN objetivo. Este mismo enfoque se puede usar si se sabe que existen polimorfismos en la región del cebador.

Para el cebador "inverso", que hibrida con la hebra convertida, las A reemplazan las G en posiciones opuestas convertidas en C.

(4) Verificación de la amplificación selectiva de la secuencia objetivo

La banda amplificada de PCR se puede analizar para comprobar que se ha derivado de ADN que ha sido totalmente convertido con bisulfito (por ejemplo, las C no metiladas en el ADN original han sido convertidas en U y amplificadas como T) y para verificar además que el ADN amplificado se ha derivado de la secuencia específica de ADN objetivo y tiene el perfil esperado de metilación (es decir, de 5meC no convertida en T). Los métodos para llevar a cabo estas verificaciones incluyen:

(a) Uso de digestión con enzimas de restricción.

Con el fin de verificar la conversión completa, se pueden usar enzimas de restricción particulares para cortar el ADN. Los sitios de reconocimiento de la secuencia deben tener la propiedad de que no contienen C y están presentes en la secuencia de la hebra amplificada después, pero no antes del tratamiento con bisulfito. Por lo tanto, la conversión de una o preferiblemente dos o más C en U y su amplificación como T en el producto de la PCR debe producir un nuevo sitio de restricción. Las enzimas útiles se muestran en cursiva en la Tabla 1 a continuación.

Con el fin de verificar que la secuencia de ADN objetivo amplificado estaba específicamente metilado, puede hacerse uso de sitios enzimáticos de restricción cuyos únicos nucleótidos C se encuentran como dinucleótidos CpG y que, si la secuencia estaba metilada, permanecería como CpG de en los productos de PCR. Los ejemplos de tales enzimas se muestran en negrita en la Tabla 1 a continuación. También se puede utilizar *BsmBI*, que corta la secuencia no simétrica GAGACG.

En algunos casos, las enzimas que contienen una C como base exterior en su secuencia de reconocimiento se pueden utilizar para la verificación de la metilación: por ejemplo, *EcoRI* (GAATTC) para una secuencia GAATTCG o *Sau3AI* (GATC) para una secuencia GATCG (negrita y subrayada en la Tabla 1). Si un sitio tal como uno de los anteriores está presente en el ADN metilado predicho, totalmente convertido con bisulfito, entonces la enzima cortará el ADN sólo si el dinucleótido CpG original fue metilado, confirmando la amplificación de una región metilada de ADN. Algunas de las enzimas (negrita y subrayadas en la Tabla 1) tienen el potencial para ser utilizadas tanto para el seguimiento de una conversión eficiente como para la metilación de CpG.

(b) Hibridación diferencial con oligonucleótidos específicos.

Se puede usar hibridación diferencial con oligonucleótidos específicos para discriminar que el ADN amplificado reacciona completamente con bisulfito y del perfil esperado de metilación. Para demostrar la conversión completa, se preparan un par de oligonucleótidos correspondientes a la misma región dentro de la secuencia amplificada. Un oligonucleótido contiene T en todas las C que deben ser convertidas por el bisulfito, mientras que el otro contiene C en estas posiciones. Los oligonucleótidos deben contener al menos dos o tres de tales C discriminatorias y se determinan las condiciones que proporcionan una hibridación selectiva de cada uno con su secuencia objetivo. Se utilizan oligonucleótidos similares con C o T en los sitios CpG y las T que reemplazan todas las C que no son CpG para determinar si los sitios específicos CpG están metilados. Los oligonucleótidos de control adicionales que no contienen C discriminatorias, es decir, ya sea sin C o una cantidad mínima donde C están sustituidas con Y (mezcla de C y T), se utilizan para controlar la cantidad de producto de la PCR en la muestra. Los oligonucleótidos se pueden utilizar para la detección de la hibridación directa de secuencias amplificadas o se usan para seleccionar moléculas objetivo de la población de ADN amplificado por PCR para otros métodos de detección. Se puede utilizar una matriz de tales oligonucleótidos en un chip de secuenciación de ADN para establecer la secuencia del ADN amplificado a lo largo de la región de la secuencia.

(c) Extensión del cebador de un solo nucleótido (SNUPE).

La técnica de extensión del cebador de un solo nucleótido se puede aplicar a los productos de la PCR para determinar si los sitios específicos dentro de la secuencia amplificada contienen bases C o T. En este método, un cebador colindante con la posición de interés se hibrida con el producto de la PCR y se llevan a cabo reacciones de extensión del cebador utilizando ya sea sólo dCTP o solo dTTP. Los productos pueden ser separados por electroforesis en gel y cuantificados para determinar la proporción de cada nucleótido en la población en esa posición. Los cebadores deben ser diseñados para cuantificar la conversión de C en sitios CpG y C de control que no deben ser metilados. Se puede incluir más de un cebador en una única reacción y/o correr en la misma pista del gel siempre y mientras que sus tamaños pueden ser claramente distinguidos.

(d) Control en tiempo real con fluorescencia de la PCR.

Los oligonucleótidos internos a la región amplificada se pueden utilizar para controlar y cuantificar la reacción de amplificación al mismo tiempo que se demuestra la amplificación de la secuencia correcta. En el ensayo de la PCR 5' Nucleasa fluorogénica (19) se controló la reacción de amplificación usando un cebador que se une internamente dentro de la secuencia amplificada y que contiene tanto un reportero fluorogénico como un inactivador. Cuando esta sonda se une a su ADN objetivo puede ser escindido por la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa, separando al reportero y al inactivador. Mediante la utilización en el ensayo de un oligonucleótido que es selectivo para la secuencia completamente convertida con bisulfito (y/o su estado de metilación), se pueden controlar tanto el nivel de amplificación como su especificidad en una sola reacción. También se pueden utilizar otros sistemas relacionados que detectan de manera similar los productos de la PCR por hibridación.

Ejemplo 1: Perfil de la secuencia de metilación de ADN de GST-Pi objetivo y no objetivo

Materiales y métodos

La Figura 1 muestra la organización del gen para la GST-Pi y las regiones para las que se utilizó la secuenciación genómica para determinar el estado de metilación del ADN aislado de líneas celulares o tejido de cáncer de próstata y de tejido de próstata normal o de otros tejidos. La numeración de la secuencia de nucleótidos en la Figura 1 está de acuerdo con la secuencia de GST-Pi, GenBank, acceso No. M24485. También se muestra, dentro de las cajas la secuencia de cada región amplificada, con todos los sitios CpG indicados y numerados en relación con la posición del sitio de inicio de la transcripción. El análisis de secuencia demostró que había un dinucleótido CpG adicional (+9) no predicho a partir de la secuencia publicada. También se identificó en las regiones secuenciadas un polimorfismo que está presente en una fracción significativa de las muestras estudiadas. El alelo polimórfico no contiene el sitio CpG -33. Tanto el dinucleótido CpG adicional como el polimorfismo se muestran en la Figura 2. Las coordenadas del nucleótido en la Figura 2 se muestran con relación al sitio de inicio de transcripción; la primera base mostrada, -434, corresponde a la base 781 de la secuencia del GenBank, mientras que la última +90, corresponde a la base 1313 de la secuencia del GenBank.

La Tabla 2 enumera las secuencias y posiciones de los cebadores no selectivos usados para la amplificación (Tabla 2-1) y la secuenciación directa (Tabla 2-2) del ADN tratado con bisulfito.

El ADN aislado a partir de tejido normal de próstata, tejido de cáncer de próstata, líneas celulares derivadas de cáncer de próstata y otros tejidos fue tratado con bisulfito y se llevaron a cabo las reacciones PCR mediante procedimientos estándar (13). Los productos de la PCR o bien se digirieron con enzimas de restricción informativas, secuenciadas directamente (17), o se clonaron y secuenciaron moléculas individuales mediante procedimientos estándar.

Resultados

En la Figura 3A, se muestran el estado de metilación de sitios en el ADN de líneas celulares de cáncer de próstata, muestras de tejido de cáncer de próstata y tejido normal de próstata emparejados para las regiones promotoras centrales a través del extremo 3' del gen (que abarca los sitios CpG -28 a 103). Se puede observar que en el tejido normal de próstata, la región promotora central no está metilada en todos los sitios y que esta falta de metilación se extiende a través de la región que flanquea al promotor hasta el sitio CpG +33. Resultados de digestiones con enzimas de restricción de ADN amplificado por PCR, tratado con bisulfito, indican que esta falta de metilación incluye los sitios CpG +52 y +53. Sin embargo, en las regiones más secuencia abajo que se analizaron, los sitios CpG +68 a +74 y +96 a +103, el ADN de tejido prostático normal estaba muy metilado. Un análisis de la línea celular de cáncer de próstata LNCaP y de muestras de tejido de cáncer de próstata demuestra una metilación exhaustiva de la región promotora central; las variaciones en el nivel global de metilación probablemente reflejan la presencia de diferentes niveles de células normales dentro de las muestras tumorales. Se encontró que el ADN de una muestra de cáncer (2AC) está completamente no metilado y en contraste con las otras muestras tumorales, se encontró mediante inmunohistoquímica que aún expresa GST-Pi. La secuenciación de la región que flanquea al promotor central en la línea celular LNCaP y los ADN tumorales, BC y CC, mostró que la metilación se extendió a través del sitio CpG +33 y un análisis adicional con enzimas de restricción mostró que la metilación incluyó sitios CpG +52 y +53. Para una muestra de tumor, DC, la metilación no se extendió más allá de la región promotora central y se encontró que los sitios CpG +13 a +33, así como los sitios CpG +52 y +53 no estaban metilados. Es notable que este tumor fuera de grado Gleason 2+2, el tumor de grado más bajo entre los analizados. Para todas las muestras de ADN tumoral, como para las de ADN normal, las regiones secuencia abajo del gen, sitios de 68 a 74 y 96 a 103, estaban fuertemente metiladas. Dentro de las regiones promotoras que se metilaron en sitios individuales específicos de tejido canceroso, pero no normal, fue evidente cuáles eran o bien metiladas o no metiladas en un grado mucho menor que los sitios metilados circundantes. Estos incluyen los sitios de -22 y -23 (XC), -20 (líneas PC3, XC y WC), -14 (PC3, XC y WC), +24 (PC3-M y MM2, CC), +25 (LNCaP, PC3-MM2, CC).

Los resultados mostrados en la Figura 3B proporcionan una comparación del estado de metilación de la región promotora central y las secuencias en dirección 5' de la región promotora central en el ADN aislado a partir de tejido de próstata normal y de una cantidad de otros tejidos normales. Las secuencias del fragmento de PCR en dirección 5' del promotor central se determinaron mediante la clonación y secuenciación ya que la región es reacia a la secuenciación directa. Para las muestras de cáncer, el nivel de metilación mostrado es como una proporción de aquellos clones que fueron metilados (alrededor de 50% de los clones totales en ambos casos). En el tejido normal de próstata, así como en todos los demás tejidos normales existe una amplia metilación de sitios CpG en dirección 5' de la repetición rica en AT. Secuencia abajo de la repetición (desde el sitio CpG -43) se observó una metilación mínima en todos los tejidos normales, excepto en tejido normal del hígado, donde hubo una metilación significativa de sitios CpG -7 hasta +7. Las secuencias en dirección 5' del promotor central resultaron ser fuertemente metiladas en los ADN de cáncer de próstata, aunque nuevamente sitios específicos no fueron metilados; sitio -32 en cánceres B y D y sitio -36 en cáncer B.

Los resultados por lo tanto permiten la identificación de una región del gen para la GST-Pi y sus secuencias flanqueadoras reguladoras, que se extiende desde 3' de la región de repetición polimórfica, (sitio CpG -43) hasta los sitios +52 y +53, que no se metilaron en el tejido normal de próstata pero normalmente es altamente metilado en el cáncer de próstata. En una muestra de cáncer (D, el cáncer de más bajo grado de Gleason) la región de los sitios CpG +13 a +53 no se metiló. La región más restringida que se extiende desde el sitio CpG -43 a +10 se metiló en todos los ADN de cáncer de próstata que mostró metilación del promotor. La metilación de una parte de la región promotora (sitios CpG -7 a +7) también se observó en un tejido normal (hígado) examinado. El análisis de muestras adicionales de ADN de hígado normal ha demostrado que el nivel de metilación es variable y puede incluir sitios CpG -13 a +8,

Discusión

Los resultados anteriores son críticos en la identificación de regiones dentro del gen para la GST-Pi y/o sus secuencias flanqueadoras reguladoras que se pueden utilizar para el desarrollo de ensayos para la detección selectiva de células de cáncer de próstata. Por lo tanto, la región de los sitios CpG -43 a +53 que se encuentran dentro de los límites de las regiones metiladas en el tejido normal de próstata se puede utilizar para el diseño de cebadores para detectar la metilación específica del cáncer en muestras de tejido de próstata. Se prefiere la región del sitio CpG -43 a +10 para la detección de una mayor proporción de cánceres. La región de los sitios CpG +13 a +53 se puede usar para detectar cáncer, pero también se puede usar para distinguir un cáncer temprano (no metilado) de uno tardío (cáncer metilado). Para los ensayos que utilizan otras muestras, tales como sangre, se prefiere restringir la región elegida para excluir los sitios CpG -7 a +7 o, más preferiblemente los sitios -13 a +8. Por ejemplo, pueden estar presentes células hepáticas en la sangre tomada de un sujeto que padece una enfermedad del hígado, en cuyo caso, se podría obtener un resultado falso positivo si la región elegida para la detección de la metilación específica del cáncer incluye sitios CpG -13 a +8.

Ejemplo 2: Diseño y uso de cebadores selectivos para la detección de ADN de GST-Pi metilado

Materiales y métodos

Los cebadores de secuencia para la detección de secuencias de GST-pi metiladas de tres regiones, a saber, una región secuencia arriba del promotor central (cebadores CGPS-5 a 9 y CGPS-11 a 13), una región que abarca parcialmente el promotor central (cebadores CGPS-1 a 4), y una región más secuencia abajo del promotor central (cebadores CGPS-21 a 24) se muestran en la Tabla 3 más adelante.

La secuencia y la derivación de cebadores para la región secuencia arriba se muestran en la Figura 2 (desde el sitio CpG -43 hasta el sitio CpG +10), que también muestra el polimorfismo común que abarca el sitio CpG -33 (véase más arriba la secuencia (p)). Debajo se muestra la secuencia de la hebra derivada después de la conversión de citosinas en uracilo. La hebra derivada se muestra ya sea asumiendo que todos los CpG están metilados (B-M), o que ninguno lo está (B-U). Por debajo de esta se muestran cebadores específicos diseñados para amplificar selectivamente la secuencia metilada. Se puede observar que todos los cebadores están diseñados para coincidir perfectamente con la plantilla metilada tratada, pero contienen faltas de coincidencia con la plantilla derivadas del ADN no metilado o el ADN original no tratado. Los cebadores CGPS-5, 8, 11, 12 y 13 están diseñados para evitar la región polimórfica y sitios CpG que muestran una menor frecuencia de metilación en los ADN de cáncer de próstata. Las T subrayadas en los cebadores directos (y las A en los cebadores inversos) se derivan de la conversión con bisulfito de las C y proporcionan la discriminación contra la amplificación de ADN que no se ha convertido de manera eficiente por el tratamiento con bisulfito. Las C en negrita en los cebadores directos (y las G en los cebadores inversos) hacen parte de los sitios CpG y formarán pares de bases con el ADN derivado de secuencias metiladas pero forman fastas de correspondencia con el ADN derivado de secuencias no metiladas. Se incluye redundancia en algunas posiciones, Y (= mezcla de C y T) en cebadores directos y R (= mezcla de A y G) en cebadores inversos para permitir el emparejamiento independiente del estado de metilación. Esto puede permitir ciertos sitios donde la frecuencia de metilación dentro o entre muestras de tumor es variable (por ejemplo, sitio -14). Los cebadores directos e inversos para la amplificación selectiva específica de secuencias metiladas de GST-pi se muestran en la Tabla 3 más adelante.

Las amplificaciones realizadas para este ejemplo, utilizaron los ADN tratados con bisulfito de una variedad de tejidos y se utilizaron dos conjuntos de cebadores de PCR. Específicamente, para las reacciones de amplificación mostradas en la Figura 4A Panel A (región que cubre el sitio de inicio de la transcripción), se utilizaron CGPS-1 y 3 como cebadores externos y CGPS-2 y 4 como cebadores internos. Para las reacciones de amplificación que se muestran en la Figura 4A Panel B y la Figuras 4B y 4C, el par de cebadores externos, CGPS-5 y CGPS-8 que abarcan la región de sitios CpG -39 a -16, se utilizaron para la primera ronda de amplificación, seguido por la segunda ronda de amplificación con los cebadores CGPS-6 y CGPS-7, lo que resulta en la amplificación de un fragmento de 140 pb que abarca los sitios CpG -36 a -23. Para las reacciones de amplificación que se muestran en las Figuras 5 a 8, el conjunto de cebadores utilizado para la región secuencia arriba era el par de cebadores externos, CGPS-5 y CGPS-8, para la primera ronda de amplificación y el par de cebadores internos, CGPS-11 y CGPS-12, para la segunda ronda de amplificación, lo que resulta en la amplificación de un fragmento de 167 pb que abarca los sitios CpG -38 a -23.

Para todos los conjuntos de cebadores, se realizaron amplificaciones por PCR en un regulador que consiste en Tris/HCl 67 mM, sulfato de amonio 16,6 mM, 1,7 mg/ml de BSA y $MgCl_2$ 1,5 mM, preparado en regulador TE (Tris/HCl 10 mM pH 8,8, EDTA 0,1 mM). Las mezclas de reacción (50 μ l) contenían 200 μ M de cada uno de los cuatro dNTP, 6 ng/ml de cada cebador y 2 unidades de ADN polimerasa AmpliTaq (Perkin Elmer). Para los cebadores CGPS-5 y 8 (primera ronda de amplificación), las condiciones del ciclo de PCR fueron 5 ciclos de 60°C 1 min, 72°C 2 min, y 95°C 1 min, seguido por 30 ciclos de 65°C 1 min, 72°C 1,5 min y 95°C 1 min. Las condiciones de amplificación para los cebadores CGPS-6 y 7 (segunda ronda de amplificación) fueron 5 ciclos de 65°C 1 min, 72°C 2 min y 95°C 1 min, seguido por 30 ciclos de 65°C 1 min, 72°C 1,5 min y 95°C 1 min. Para los cebadores CGPS-11 y 12, las condiciones de amplificación fueron las mismas que para los cebadores CGP-6 y 7 excepto porque la temperatura de hibridación se elevó de 65°C a 70°C. Se usaron 2 μ l de las reacciones de la primera ronda de amplificación en 50 μ l de la segunda ronda de reacciones de amplificación. También se pueden usar otros reguladores o condiciones de amplificación por PCR para lograr una eficiencia y especificidad similares.

Resultados y discusión

Para los cebadores que cubren la región promotora central (véase la Figura 4A Panel A), se obtuvo ADN amplificado (véase la banda señalada por la flecha) a partir del ADN de control positivo (cáncer B), pero también a partir de ADN de muestras de tejido de próstata de dos sujetos que no habían sido diagnosticados con cáncer de próstata. Las bandas de ADN amplificado también fueron observadas a partir de ADN aislado de una muestra de médula ósea y sangre, así como a partir de ADN aislado de muestras de tejido hepático de sujetos sin cáncer de próstata conocido.

Para la amplificación secuencia arriba (véase la Figura 4A Panel B), no se obtuvo ADN amplificado a partir de reacciones de amplificación llevadas a cabo sobre el ADN aislado de una serie de muestras de tejidos sanos ni de ADN aislado de muestras de sangre de sujetos sin cáncer de próstata conocido; se produjo una banda de ADN amplificado a partir del ADN de control positivo (cáncer B). Sin embargo, aunque las reacciones de amplificación llevadas a cabo sobre el ADN aislado a partir de una muestra de tejido normal de próstata no dieron lugar a ADN amplificado, el ADN amplificado fue el resultado de las mismas reacciones de amplificación llevadas a cabo sobre el ADN aislado a partir de una muestra de tejido de la próstata de un sujeto 82 años de edad sin cáncer de próstata conocido. Es posible que este

sujeto tuviera cáncer de próstata no diagnosticado. El ADN aislado de otras cinco muestras de tejido normal de próstata de sujetos sin cáncer de próstata conocido no dio lugar a un producto de ADN amplificado (véase la Figura 4C Panel B).

En la Figura 4B, los resultados de las reacciones de amplificación por PCR se muestran para muestras de tejido de pacientes con cáncer de próstata: para cada muestra, se aisló el ADN de una región identificada por tener cáncer y de otra región identificada como macroscópicamente normal. En todos los casos, se produjo una banda clara de ADN amplificado a partir de reacciones de amplificación llevadas a cabo sobre el ADN de cáncer de próstata. Dos de ellos, fueron casos en los que la proporción de ADN metilado era insuficiente para ser detectado usando cebadores diseñados para cebar en forma equivalente en el ADN metilado y no metilado. Para el ADN aislado a partir de tejido macroscópicamente normal, la banda de ADN amplificado estaba o bien ausente o presente en una cantidad sustancialmente inferior. La presencia de una banda en algunas muestras "normales" podría derivarse de un bajo nivel de células cancerosas en la muestra.

La amplificación de ADN de muestras de sangre obtenidas de la cavidad abdominal durante la cirugía mostró que era posible detectar secuencias metiladas de GST-Pi en una cantidad de ellas. Las muestras de sangre periférica aisladas a partir de tres pacientes con enfermedad metastásica conocida (véase la Figura 4C Panel B) demostró la presencia de secuencias metiladas de GST-pi que pueden ser amplificadas.

Productos de ADN amplificados también se produjeron a partir de la amplificación de ADN aislado de las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP y DU145, pero no de la serie PC-3 de las líneas celulares. Este último resultado podría ser debido a un bajo nivel de metilación en la región promotora secuencia arriba en células PC-3, pero un factor importante que contribuye es probable que sea una falta de cebado por parte el cebador CGPS-6 ya que PC-3 sólo contiene la variante alélica del gen para la GST-Pi. También se detectaron secuencias metiladas de GST-pi en el ADN aislado a partir de algunas líneas celulares derivadas de tumores de origen no prostático: HeLa, un carcinoma cervical, y HepG2, un carcinoma de hígado (véase la Figura 4C Panel B).

Se aisló el ADN a partir del fluido seminal (véase la Figura 5) de 3 pacientes con cáncer de próstata (C) y de 5 sujetos sin cáncer de próstata conocido (N), se lo trató con bisulfito y se amplificó usando cebadores CGPS-5 y 8 seguido por CGPS-6 y 7. Los productos de ADN amplificados se obtuvieron a partir de los tres ADN cancerosos. Una de las cinco muestras de sujetos sin cáncer de próstata diagnosticado también dio lugar a un producto de ADN amplificado, pero no está claro si esto representa un falso positivo o un caso de cáncer de próstata no diagnosticado en el sujeto en particular.

El uso del cebador CGPS-11 evita la hibridación a través de la secuencia polimórfica en el sitio CpG -33, y se encontró que la combinación de CGPS-5 y 8 como cebadores externos seguida por CGPS-11 y 12 como cebadores internos produce una amplificación eficaz del ADN de cáncer de próstata. En un primer experimento (véase la Figura 6), se extrajo ADN de las regiones de portaobjetos con tejido fijado que han sido identificados ya sea por ser cancerosas o estar enfermas con hiperplasia benigna (HPB). Se aisló el ADN incubando el material raspado en 400 µl de clorhidrato de guanidina 7M, EDTA 5 mM, Tris/HCl 100 mM pH 6,4, 1% de Triton-X100, 50 mg/ml de proteinasa K y 100 mg/ml de ARNt de levadura. Después de la homogeneización, se incubaron las muestras durante 48 horas a 55°C, después se sometieron a cinco ciclos de congelación/descongelación de hielo seco durante 5 min/95°C durante 5 min. Después de agitación tipo vórtice y centrifugación durante 2 min en una microcentrífuga, se diluyeron luego los sobrenadantes tres veces, se extrajo con fenol/ cloroformo y se precipitó con etanol. El ADN aislado de las muestras de 6 pacientes con cáncer y 4 con HPB se amplificaron ya sea con cebadores no selectivos para la región promotora central (es decir, la amplificación por PCR de control con GST-9 y 10 seguida por GST-11 y 12) o cebadores selectivos de CG (es decir, amplificación selectiva por PCR con CGPS-5 y 8 seguida por CGPS-11 y 12). Las amplificaciones por PCR de control demostraron la presencia de ADN amplificable en todas las muestras. Usando los cebadores selectivos de CG, se obtuvieron únicamente productos de ADN amplificados de los ADN cancerosos. Los niveles de PSA (antígeno prostático específico) de estos pacientes oscilaron desde 4 hasta 145 ng/ ml. Para los pacientes con HBP, los niveles de PSA oscilaron desde 2,3 hasta 25 ng/ml.

En otros experimentos, las células de cáncer de próstata se enriquecieron primero a partir de muestras de sangre usando anticuerpos acoplados a perlas magnéticas seguidos por el aislamiento del ADN, modificación con bisulfito y amplificación por PCR. El aislamiento de las células se logró utilizando anti-células epiteliales Dynabeads (Dynal Prod. No. 112.07) esencialmente como lo describe el fabricante. Las perlas magnéticas se recubrieron con el anticuerpo anti-epitelial mAb Ber-EP4 (22). Alternativamente, se podrían haber utilizado perlas magnéticas acopladas con anticuerpos específicos para el dominio extracelular del antígeno de membrana específico de la próstata (23). Se diluyó la sangre entera 1:1 con solución salina regulada con fosfato de Dulbecco (PBS) que contenía EDTA 10 mM y 40 µl de perlas magnéticas prelavadas adicionales. Las células se incubaron a 4°C en una plataforma giratoria durante 30 min y luego se recogieron las perlas en el costado del tubo utilizando un dispositivo magnético de separación de células durante 4 min. Se aspiró luego cuidadosamente el sobrenadante y se resuspendieron las perlas en la solución de lavado (PBS que contenía 0,5% de albúmina de suero bovino). Se recolectaron luego nuevamente las perlas en el costado del tubo usando un imán y se aspiró cuidadosamente el sobrenadante antes de realizar un lavado adicional con el resto del tubo colocado en el dispositivo de separación magnética y se aspiró el sobrenadante. Se resuspendieron luego las perlas en regulador para aislamiento de ADN (Tris/HCl 100 mM pH 8, EDTA 25 mM, 1% de Sarkosyl, 200 mg/ml de proteinasa K),

se incubó durante al menos 2 h a 37°C y se recuperó el ADN mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol. El ADN fue finalmente sometido a tratamiento con bisulfito y amplificación por PCR.

La sensibilidad de este método fue probado mediante la siembra de diferentes cantidades de células de una línea celular de cáncer de próstata, LNCaP, en sangre normal. Como se muestra en la Figura 7A, la presencia de 20 células o más en 0,5 ml de sangre se podría detectar de forma confiable. El experimento mostrado en la figura 7B mostró que las muestras de sangre que contenían células LNCaP podrían ser almacenadas a temperatura ambiente o a 4°C por hasta 24 horas sin pérdida de sensibilidad.

Usando captura con perlas magnéticas seguido por el tratamiento con bisulfito y la amplificación selectiva por PCR, también se analizaron muestras de sangre de pacientes y los resultados de un conjunto de éstas se muestran en la Figura 8. Estas incluyen muestras de sangre de sujetos normales sin ninguna enfermedad conocida de la próstata, de pacientes con hiperplasia benigna (HPB) de la próstata y de pacientes con cáncer de próstata confirmado histológicamente. Las amplificaciones por PCR de control (panel superior) usaron cebadores que amplifican tanto secuencias de GST-Pi metiladas como no metiladas. Las amplificaciones utilizando cebadores selectivos para CG se muestran en el panel inferior. Las amplificaciones de control positivo (LNCaP (L) y PC3 (P)) se muestran en los paneles de cáncer y las amplificaciones de control negativo se muestran en los paneles normales y de cáncer.

La Tabla 4 más adelante resume los resultados de las pruebas de ADN a partir de muestras de sangre de pacientes usando un protocolo de amplificación por PCR selectivo para CG con perlas magnéticas. No se obtuvieron productos de ADN amplificados a partir de ADN aislado de los sujetos de control normales, y sólo ADN aislado de uno de 18 pacientes diagnosticados histológicamente por tener HPB produjo productos de ADN amplificados (este paciente tenía un nivel de PSA en la sangre de 17 ng/ml). De los pacientes con cáncer de próstata confirmado, el ADN aislado de 17 de 24 pacientes (70%) fueron positivos por PCR (es decir, resultaron en la producción de ADN amplificado), lo que indica la presencia de células de cáncer de próstata en la sangre. Para los pacientes catalogados clínicamente como A y B, (es decir, enfermedad confinada a la próstata), se detectaron células cancerosas en la sangre en 6 de los 10 casos. Para 9 pacientes con enfermedad localmente invasiva (Etapa C) o metastásica (Etapa D), se detectaron células cancerosas en la sangre en cada caso.

Dado que se encontró que la línea celular de cáncer de hígado HepG2 contenía secuencias metiladas de GST-Pi, también se examinaron muestras de ADN aisladas de tejido canceroso de hígado. El ADN aislado a partir de 20 muestras de cáncer de hígado fue tratado con bisulfito y amplificado utilizando los pares de cebadores CGPS-5 y 8 y CGPS-11 y 12 (véase la Figura 9). 14 de las 20 muestras fueron positivas por PCR. Por otro lado, no se produjeron productos de ADN amplificados a partir de ADN aislado de 2 pacientes sin cáncer de hígado (véase la Figura 4 y datos no mostrados). Se demostró que el ADN aislado de tejido de hígado normal estaba parcialmente metilado en la región del sitio de inicio de la transcripción (sitios CpG -7 a +7, véase la Figura 3B). El análisis de muestras adicionales de ADN de hígado normal ha demostrado que el nivel de metilación es variable y puede incluir sitios CpG de -13 a +8. Los pares de cebadores utilizados aquí abarcan los sitios CpG -39 a -16, secuencia arriba de la región de metilación observada en ADN de hígado normal.

Los resultados anteriores muestran que los diferentes conjuntos de cebadores diseñados para hibridar el promotor central del gen para la GST-Pi o la región secuencia arriba del promotor central, pueden amplificar de manera confiable el ADN tratado con bisulfito que ha sido aislado a partir de células de cáncer de próstata. Sin embargo, los cebadores diseñados para hibridar con el promotor central son menos selectivos ya que los ADN aislados a partir de una serie de muestras de tejido normal resultan en productos de ADN amplificados. Por lo tanto, los cebadores diseñados para hibridar con regiones que se encontró que no estaban metiladas en el ADN de tejidos normales, es decir, la región secuencia arriba que abarca los sitios CpG -45 a -8 y la región secuencia abajo del promotor que abarca los sitios CpG +8 a +53, son las preferidas para los ensayos de pronóstico o diagnóstico de cáncer de próstata. Adicionalmente, los cebadores diseñados para hibridarse con esta última región también pueden ser útiles para discriminar entre el cáncer de próstata temprano y tardío.

Ejemplo 3: Confirmación de una amplificación correcta

Las sondas de oligonucleótidos específicos descritos a continuación se puede utilizar para confirmar que cualquiera de los productos de ADN amplificados resultantes de la etapa de amplificación del ensayo son debidos a ADN en el que todas las citosinas no metiladas habían sido convertidas a uracilos. Aquellas para la región de la PCR secuencia arriba se puede utilizar con productos de ADN amplificados a partir de todas las combinaciones de los cebadores CGP-5, 6, 11, 7 a 9, 12 y 13 directos e inversos. Aquellos para la región de la PCR secuencia abajo se puede utilizar con productos de ADN amplificados de los cebadores CGP-21 a 24. Una versión biotinilada del oligonucleótido específico para la conversión también se puede utilizar para la captura selectiva y específica de la solución de los productos de ADN amplificados generados utilizando estos pares de cebadores, o el oligonucleótido apropiadamente marcado se puede utilizar para el seguimiento en tiempo real de la amplificación de un fragmento específico de PCR. Los productos de ADN amplificados a partir de la amplificación por PCR de ADN tratado con bisulfito habitualmente tienen una hebra que contiene una proporción muy alta de nucleótidos de timina y la otra hebra que contiene una proporción muy alta de nucleótidos de adenina. Debido a esto, es posible utilizar oligo dT (u oligo dA) como un oligonucleótido específico de la

conversión genérica, siendo las condiciones de hibridación diferentes para optimizar la discriminación de ADN convertido y no convertido para cada fragmento de PCR.

Región de la PCR secuencia arriba:

Oligonucleótido de conversión:

5 HybC5: 5'-AAACCTAAAAAATAAACAAACAA (SEQ ID NO: 17)

Oligonucleótido que no es de conversión:

HybU5: 5'-GGGCCTAGGGAGTAAACAGACAG (SEQ ID NO: 18)

Oligonucleótido neutro de conversión:

HybN5: 5'-CCTTTCCCTCTTTCCARRTCCCCA (SEQ ID NO: 19)

10 Región de la PCR secuencia abajo:

Oligonucleótido de conversión:

HyBC3: 5'-TTTGGTATTTTTTTTCGGGTTTTAG (SEQ ID NO: 20)

Oligonucleótido que no es de conversión:

HybU3: 5'-CTTGGCATCCTCCCCGGGCTCCAG (SEQ ID NO: 21)

15 Oligonucleótido neutro de conversión:

HybN3: 5'-GGYAGGGAAGGGAGGYAGGGGYTGGG (SEQ ID NO: 22)

Para demostrar la selectividad de tales hibridaciones, se transfirieron una serie de ADN a membranas de nailon y se hibridaron con sondas de oligonucleótidos específicas de conversión y no de conversión para la región de PCR secuencia arriba, así como un oligonucleótido de control. Los ADN incluyen:

20 (i) los productos de la PCR clonados individuales de la amplificación de la región secuencia arriba que contenía diferentes cantidades de citosinas convertidas en la región complementaria a la sonda (véase la Figura 10, donde se muestra el número de citosinas convertidas, de cada 10, (columna 1 y 2 manchas superiores de la columna 2), nótese bien los dos clones que contienen 10/10 bases extremas adyacentes y que no contienen las secuencias complementarias al oligonucleótido de control); y

25 (ii) los productos de la PCR de pacientes con cáncer y pacientes con hiperplasia benigna que habían sido amplificados a partir de ADN tratado con bisulfato usando cebadores selectivos para CG (CGPS-5 y 8, seguidos por CGPS 11 y 12) (véase la Figura 10, donde estos son etiquetados como muestras de cáncer 1 a 4 (parte inferior de la columna 2) y muestras de HPB 1 a 4 (columna 3)).

30 Las hibridaciones con sondas de oligonucleótidos con quinasa se realizaron en regulador Express-Hyb (Clontech) a 45°C durante dos horas seguido por cuatro lavados de 20 min en 2X SSC, 0,1% de SDS a 45°C antes del análisis de la placa de fósforo fotoestimulable.

Las hibridaciones con las sondas de oligonucleótidos de control proporcionan una estimación de la cantidad de ADN en la muestra. Como era de esperar, ninguna de las amplificaciones por PCR de muestras de HPB produjo un producto significativamente detectable, mientras que 3 de 4 muestras de cáncer produjeron una señal fuerte y una muy débil.

35 Las hibridaciones con la sonda específica de conversión mostraron una clara señal para los ADN del plásmido que coincidían con la sonda perfectamente y para las 3 muestras de cáncer para las que existía una hibridación más fuerte con la sonda de oligonucleótido de control. La cuarta muestra de cáncer que produjo una señal muy débil con el oligonucleótido de control fue apenas detectable con la sonda específica de conversión. Esto podría haber sido debido al bajo nivel de ADN o, posiblemente, la presencia de moléculas de ADN parcialmente convertidas. Ninguno de los clones de plásmidos que tenían fastas de correlación con la sonda de conversión específica produjo una señal significativa. La sonda para el ADN no convertido hibridó claramente con los ADN plasmídicos que tenían 0, 1 o 2 bases convertidas, pero no con muestras que tenían 8 o 10 bases convertidas. Las hibridaciones también indicaron que había un bajo nivel de amplificación de ADN no convertido en dos muestras de HPB y una de cáncer (en este último caso no

había una fuerte señal de la sonda para el ADN totalmente convertido, lo que indica que el producto de la PCR se deriva principalmente de DNA apropiadamente convertido).

Los resultados muestran que oligonucleótidos del tipo utilizado aquí puede discriminar entre moléculas que han sido convertidas de manera eficiente por bisulfito y aquellas que no. Pueden ser utilizados en una serie de formatos para la detección de los productos de la PCR o antes de la PCR u otros métodos de detección para seleccionar las moléculas convertidas eficientemente de la región objetivo de la población total de ADN. El mismo enfoque se puede utilizar con cebadores que distinguen los ADN metilados CpG (o sus derivados que contienen las C) a partir de los ADN no metilados (que contienen U o sus derivados que contienen T).

Referencias

- 10 1. H. S. Shapiro, Content of 6-methylaminopurine and 5-methylcytosine in DNA. G. D. Fasman, Ed., Handbook of Biochemistry, Selected Data for Molecular Biology: Nucleic Acids. (CRC Press, Boca Raton FL, 1975).
2. R. L. Adams, Burdon, R. H., Molecular Biology of DNA methylation (Springer Verlag, New York, 1985).
3. Y. Gruenbaum, T. Naveh-Many, H. Cedar, A. Razin, Nature 292, 860– 862 (1981).
4. S. J. Clark, J. Harrison, M. Frommer, Nat Genet 10, 20–27 (1995).
- 15 5. R. Holliday, J. E. Pugh, Science 187, 226–232 (1975).
6. A. D. Riggs, Cytogenet. Cell Genet. 14, 9–25 (1975).
7. M. Graessmann, A. Graessmann, in DNA Methylation: Molecular Biology and Biological Significance J. P. J. H. P. Saluz, Ed. (Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, 1993) pp. 404–424.
8. C. Stirzaker, et al, Cancer Res 57, 2229–2237 (1997).
- 20 9. K. D. Tremblay, K. L. Duran, M. S. Bartolomei, Mol Cell Biol Molecular and Cellular Biology 17, 4322–4329 (1997).
10. R. Y.–H. Wang, Gehrke, C.W. and Ehrlich, M., Nucl. Acids Res. 8, 4777– 4790 (1980).
11. R. Shapiro, B. Braverman, J. B. Louis & R. E. Servis, J. Biol. Chem. 248, 4060–4064 (1973).
12. M. Frommer, McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, CM., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L. & Paul, C. L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 1827–1831 (1992).
- 25 13. S. J. Clark, Harrison, J., Paul, C.L., & Frommer, M., Nucl. Acids Res. 22, 2990–2997 (1994).
14. J. G. Herman, J. R. Graff, S. Myohanen, B. D. Nelkin & S. B. Baylin, Proc Natl Acad Sci USA 93, 9821–9826 (1996).
15. W. H. Lee, et al, Proc Natl Acad Sci USA 91, 11733–11737 (1994).
16. S. J. Clark, M. Frommer, in Laboratory Methods for the detection of mutations and polymorphisms in DNA. G. Taylor, Ed. (CRC press, NewYork, 1997) pp. 151–162.
- 30 17. C. L. Paul, S. J. Clark, BioTechniques 21, 126–133 (1996).
18. W.H. Lee, W.B. Isaacs, G.S. Bova & W.G. Nelson, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. G, 443–450 (1997).
19. P.M. Holland, R.D. Abramson, R. Watson & D.H. Gelfand, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7276–7280 (1991).
20. F. Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 189–193 (1991).
21. R.D. Abramson and T.W. Myers, Curr. Opinion Biotechnol. 4, 41–47 (1993).
- 35 22. U. Latza, G. Niedobitek, R. Schwarting, H. Nekarda and H.J. Stein, Clinical Pathology 43, 213–219 (1990).
23. H. Liu, P. Moy, S. Kim, Y. Xia, A. Rajasekaran, V. Navarro, B. Knudsen and N.H. Bander, Cancer Res. 57, 3629–3634 (1997).

Tabla 1

	AATT	TTAA	ATAT	ACGT	CGCG	GATC	TCGA	AGAG
↓ o o o o	<i>Tsp509I</i>			Mae II		<u>Sau3A</u>		
↓ o o o o		<i>Mse I</i>					Taq I	
↓ o o o o					BstUI			
↓ o o o o				Tai I				
↓ A o o o o T	<i>Apo I</i>							
↓ A o o o o T		<i>Ase I</i>						
↓ A o o o o T			<i>Ssp I</i>					
↓ T o o o o A							<u>BstBI</u>	
↓ T o o o o A				<u>Sna BI</u>	<u>Nru I</u>			
↓ C o o o o G						<u>Pvu I</u>		
↓ G o o o o C	<u>EcoRI</u> <i>Apo I</i>							

TABLA 2.1 Cebadores para amplificación por PCR del gen para la GST- π modificado con bisulfito

PCR #	Objetivo	Nombre cebador	Tipo del cebador	Cebador del 5'	3'	Tamaño objetivo (bp)	Hibridación °C	Posición genómica
1	Hebra superior de ADN en dirección 5'	GST-1	Exterior	TTATGTAATAAAATTTGTATATTTTGTATATG (SEQ ID NO: 23)		646	50/50	381-411
		GST-25	Interior	TGTAGATTATTTAAGGTTAGGAGTT (SEQ ID NO: 24)		499	50/50	495-519
		GST-3	Interior	AAACCTAAAAATAAACAAACAACAAA (SEQ ID NO: 25)		499	50/50	967-993
		GST-4	Exterior	AAAAAACCTTTCCCTCTTTCCCAAAATCCC (SEQ ID NO: 26)		646	50/50	999-1027
1	Hebra superior de ADN Exón 1	GST-9	Exterior	TTTGTTGTTGTTTATTTTATTTTAGGTTT (SEQ ID NO: 27)		346	45/50	967-993
		GST-11	Interior	GGGATTTGGGAAAGAGGAAAGGTTT (SEQ ID NO: 28)		307	45/50	999-1025
		GST-12	Interior	ACTAAAAACTCTAAACCCCATCCC (SEQ ID NO: 29)		307	45/50	1280-1303
		GST-10	Exterior	AACCTAAATACTACC TTAACCCCAT (SEQ ID NO: 30)		346	45/50	1304-1329
2	Hebra inferior de ADN Exón 1	GST-B1	Exterior	AATCCTCTTCCTACTATCTATTTACTCCCTAAA (SEQ ID NO: 31)		387	50/55	958-990
		GST-B2	Interior	AAAACCTAAAAAATAAACCTTCCC (SEQ ID NO: 32)		314	50/55	999-1027
		GST-B3	Interior	TTGGTTTTATGTTGGGAGTTTGAGTTT (SEQ ID NO: 33)		314	50/55	1285-1313
		GST-B4	Exterior	TTTTGTGGGAGTTGGGTTTGATGTTGT (SEQ ID NO: 34)		387	50/55	1317-1345
3	Hebra superior de ADN Exón 2/Exón 3	GST-13	Exterior	GGTTAGAGTTTTTAGTATGGGGTTAATT (SEQ ID NO: 35)		691	45/50	1287-1315
		GST-14	Interior	TAGTATTAGGTTAGGGTTTT (SEQ ID NO: 36)		603	45/50	1318-1337
		GST-15	Interior	AACTCTAACCCCTAATCTACCAACAACATA (SEQ ID NO: 37)		603	45/50	1920-1892
		GST-16	Exterior	CA AAAAACTTTAAATAAACCCCTCCTACCA (SEQ ID NO: 38)		691	45/50	1978-1950

4	Hebra superior de AND Exón 5	GST-30	Exterior	GTTTTGTGGTTAGGTTGTTTTTTAGGTGTTAG (SEQ ID NO: 39)	340	55/60	2346-2376
		GST-31	Interior	GTTTTGAGTATTTGTTGTGGTAGTTTTT (SEQ ID NO: 40)	265	40/45	2381-2416
		GST-32	Interior	TTAATATAAAATAAAAAAAAAATATATTACAA (SEQ ID NO: 41)	265	40/45	2617-2646
		GST-33	Exterior	CAACCCCAATACCCCAACCCTAATACAAATACTC (SEQ ID NO: 42)	340	55/60	2653-2686
5	Hebra superior de AND Exón 7	GST-26	Exterior	GGTTTTAGTTTTTGGTTGTTGGATG (SEQ ID NO: 43)	347	50/55	3845-3869
		GST-27	Interior	TTTTTTTGTGTTTTTAGTATATGTGGGG (SEQ ID NO: 44)	287	50/55	3874-3899
		GST-28	Interior	ATACTAAAAAACTATTTTCTAATCCTCTA (SEQ ID NO: 45)	287	50/55	4161-4132
		GST-29	Exterior	CCAAACTAAAAAACTCCAAAAAACCACTAA (SEQ ID NO: 46)	347	50/55	4192-4164
Las bases que surgen debido a la conversión de C en U por el tratamiento con bisulfito se muestran en negrita							

TABLA 2.2 Cebadores para secuenciación directa de fragmentos amplificados por PCR del gen para la GST-Pi

PCR #	Objetivo	Nombre cebador	Tipo de cebador	de Cebador	Tamaño objetivo (bp)	Hibridación °C	Posición genómica
				5' 3'			
1	Hebra superior de ADN Exón 1	deGST-11	M13	IGTAAAAACGACGGCCAGTGGGATTGGGAAAGAGGG AA (SEQ ID NO: 47)	307	45/50	1003-1026
		GST-12	Biotin	BioACTAAAAAACTCTAAACCCCATCCCC	307	45/50	1288-1313
2	Hebra inferior de ADN Exón 1	deGST-B2	M13	IGTAAAAACGACGGCCAGTGTGGGAGTTTGTAGTTT T (SEQ ID NO: 48)	314	50/55	999-1027
		GST-B2	Biotin	BioAAAAACCTAAAAAATAAAAAAATAATTTCC (	314	50/55	1285-1313
3	Hebra superior de ADN Exón 2/3	deGST-14	M13	IGTAAAAACGACGGCCAGTGTAGTATTAGGTTA (SEQ ID NO: 49)	603	45/50	1317-1337
		GST-15	Biotin	BioAACTCTAACCCCTAATCTACCAACAACATA	603	45/50	1920-1892
4	Hebra superior de ADN Exón 4/5	deGST-31	M13	IGTAAAAACGACGGCCAGTGTGGGAGTATTGTGTG (SEQ ID NO: 50)	265	55/60	2381-2410
		GST-32	Biotin	BioTTAATAATAATAAAAAAATAATATTACAA	265	55/60	2617-2646
5	Hebra superior de ADN Exón 7	deGST-27	M13	IGTAAAAACGACGGCCAGTGTGGGAGTATTGTGTG (SEQ ID NO: 51)	287	50/55	3874-4132
		GST-28	Biotin	BioATACTAAAAAACTATTTCTAATCCTCTA	287	50/55	4161-4164
Las extensiones sobre cebadores "M13" para la hibridación del cebador de secuenciación están subrayadas.							

TABLA 3

Cebador	Directo o inverso	Secuencia del cebador (5'–3')	Coordenadas	Sitios CpG
CGPS–1	F	CGCGAGGTTTTCGTTGGAGTTTCGTCGTC (SEQ ID NO: 1)	1210–1238	–3 a +3
CGPS–2	F	CGTTATTAGTGAGTACGCGCGGTTC (SEQ ID NO: 2)	1247–1271	+4 a +8
CGPS–3	R	TCCCATCCCTCCCCGAAACGCTCCG (SEQ ID NO: 8)	1428–1452	+21 a +23
CGPS–4	R	GAAACGCTCCGAACCCCTAAAAACGCTAACG (SEQ ID NO: 9)	1406–1438	+19 a +23
CGPS–5	F	YGGTITTAGGGAATTTTTCGCG (SEQ ID NO: 3)	894–917	–39 a –37
CGPS–6	F	YGGYGYGTTAGTTYGTGYGTATATTC (SEQ ID NO: 4)	925–952	–36 a –31
CGPS–11	F	GGGAATTTTTTTCGCGATGTTTYGGCGC (SEQ ID NO: 5)	902–930	–38 a –34
CGPS–7	R	CRCCCTAAAATCCCCRAAATCRCCGCG (SEQ ID NO: 10)	1038–1064	–23 a –27
CGPS–8	R	ACCCCRACRACCRCTACACCCRAACGTCTG (SEQ ID NO: 11)	1077–1106	–16 a –21
CGPS–9	R	CTCTTCTAAAAAATCCCRCAACTCCCCGCCG (SEQ ID NO: 12)	1113–1143	–12 a –15
CGPS–12	R	AAAACRCCCTAAAATCCCCGAAATCGCCG (SEQ ID NO: 13)	1040–1068	–23 a –26
CGPS–13	R	AACTCCCRCCGACCCCAACCCGACGACCG (SEQ ID NO: 14)	1094–1123	–14 a –18
CGPS–21	F	TTTTIAGGGGGTITGGAGCGTTTC (SEQ ID NO: 6)	1415–1438	+21 a +23
CGPS–22	F	GGTAGGITGYGTTATCGC (SEQ ID NO: 7)	1473–1491	+26 a +28
CGPS–23	R	AAAAA, TTCRAATCTCTCCGAATAAACG (SEQ ID NO: 15)	1640–1666	+36 a +34
CGPS–24	R	AAAAACCRAAATAAAAAACACACGACG (SEQ ID NO: 16)	1676–1703	+39 a +37

Tabla 4

	Ensayo negativo	Ensayo positivo
Sujetos normales	10	0
Hiperplasia benigna	17	1
Cáncer (total)	7	17
Etapa A	1	3
Etapa B	3	3
Etapa C	0	2
Etapa D	0	7
Etapa no definida	3	2

LISTADO DE SECUENCIAS:

<110> Commonwealth Scientific and Industrial Research O

<120> ENSAYO PARA LA METILACIÓN EN EL GEN PARA LA GST-PI 1 T

<130> FB20192/A

5 <160> 59

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 29

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 1

cgcgagggtt tcgttgaggt ttcgtcgtc 29

<210> 2

<211> 25

15 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

cgttattagt gtagtacgcgc gggtc 25

<210> 3

20 <211> 24

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

yggtttagg gaattttt tcgc 24

25 <210> 4

<211> 28

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

30 ygggyggtta gtygttgyg tatatttc 28

<210> 5

<211> 29
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 5 gggaatttt ttccgcatg ttyggcgc 29
 <210> 6
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 6
 ttttagggg gtyggagcg ttc 24
 <210> 7
 <211> 19
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 ggtaggtty gttatcgc 19
 <210> 8
 <211> 27
 20 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 aaaaattcra atctctccga ataaacg 27
 <210> 9
 25 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 aaaaaccraa ataaaaacca cacgacg 27
 30 <210> 10
 <211> 25

<212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 10
 tcccatccct ccccgaaacg ctccg 25
 5 <210> 11
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 10 gaaacgctcc gaacccccta aaaaccgcta acg 33
 <210> 12
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 12
 crccctaata tcccraaat crccgcg 27
 <210> 13
 <211> 30
 <212> ADN
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 accccracra ccrctacacc ccraacgtcg 30
 <210> 14
 <211> 31
 25 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 ctcttctaaa aaatcccr cr aactcccgcc g 31
 <210> 15
 30 <211> 29
 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 15

aaaacrcct aaaatccccg aaatcgccg 29

<210> 16

5 <211> 30

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 16

aactccrcg gacccaacc ccgacgaccg 30

10 <210> 17

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido que se une al gen para la GST-Pi humana convertido con bisulfito

<400> 17

aaacataaa aataacaaa caa 23

<210> 18

20 <211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido que se une al gen para la GST-Pi humana no convertido

25 <400> 18

gggcctagg agtaaacaga cag 23

<210> 19

<211> 25

<212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 568 770 T3

	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido que se une al gen para la GST-Pi humana
	<400> 19
	cctttccctc tttccarrt ccca 25
	<210> 20
5	<211> 25
	<212> ADN
	<213> Secuencia Artificial
	<220>
10	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido que se une al gen para la GST-Pi humana convertido con bisulfito
	<400> 20
	tttggattt ttttcgggt ttag 25
	<210> 21
	<211> 25
15	<212> ADN
	<213> Secuencia Artificial
	<220>
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido que se une al gen para la GST-Pi humana no convertido
	<400> 21
20	cttgcatcc tccccgggc tccag 25
	<210> 22
	<211> 26
	<212> ADN
	<213> Secuencia Artificial
25	<220>
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido que se une al gen para la GST-Pi humana
	<400> 22
	ggyaggaag ggaggyaggg gytggg 26
	<210> 23
30	<211> 31
	<212> ADN

<213> Homo sapiens
 <400> 23
 ttatgtaata aatttgata tttgtatat g 31
 <210> 24
 5 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 tgtagattat ttaaggtag gagtt 25
 10 <210> 25
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 25
 15 aaacctaataa aataaataa caacaaa 27
 <210> 26
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 26
 aaaaaacatt tccctcttc ccaaatccc 29
 <210> 27
 <211> 27
 <212> ADN
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 27
 ttgtgtgtt gttattttt taggttt 27
 <210> 28
 <211> 26
 30 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 gggatttggg aaagagggaa aggttt 26
 <210> 29
 <211> 24
 5 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 actaaaaact ctaaacccca tccc 24
 <210> 30
 10 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 aacctaatac taccttaacc ccat 24
 15 <210> 31
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 20 aatcctcttc ctactatcta ttactccct aaa 33
 <210> 32
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 32
 aaaacctaata aaaaaaaaaa aaacttccc 29
 <210> 33
 <211> 29
 <212> ADN
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 33

	ttggttttat gttgggagtt ttgagtttt	29
	<210> 34	
	<211> 29	
	<212> ADN	
5	<213> Homo sapiens	
	<400> 34	
	tttgtgggg agttggggtt tgatgttgt	29
	<210> 35	
	<211> 29	
10	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 35	
	ggttagagt ttttagtatg gggtaatt	29
	<210> 36	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 36	
	tagtattagg ttagggtttt	20
20	<210> 37	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 37	
25	aactctaacc ctaatctacc aacaacata	29
	<210> 38	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 38	
	caaaaaactt taaataaacc ctctacca	29

<210> 39
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 39
 gttttgtggt taggtgttt ttaggtgtt ag 32
 <210> 40
 <211> 30
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 40
 gttttgagta ttgttgtgt gtagtttt 30
 <210> 41
 <211> 30
 15 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 41
 ttaatataaa taataaaaaat atattacaa 30
 <210> 42
 20 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 42
 caacccccaa tacccaaccc taatacaaat actc 34
 25 <210> 43
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 43
 30 ggtttagtt ttggtgtt tggatg 26
 <210> 44

<211> 26
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 44
 5 ttttttgtt ttttagtatat gtgggg 26
 <210> 45
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 10 <400> 45
 atactaaaa aactattttc taatcctcta 30
 <210> 46
 <211> 29
 <212> ADN
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 46
 ccaaactaaa aactccaaaa aaccactaa 29
 <210> 47
 <211> 38
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido de GST–Pi humana M13
 <400> 47
 25 tgtaaaacga cggccagtgg gatttgggaa agagggaa 38
 <210> 48
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido de GST–Pi humana M13

<400> 48
 tgtaaaacga cggccagtgt ttgggagttt tgagtttt 38
 <210> 49
 <211> 31
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido de GST–Pi humana M13
 <400> 49
 10 tgtaaaacga cggccagtta gtattaggtt a 31
 <210> 50
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido de GST–Pi humana M13
 <400> 50
 tgtaaaacga cggccagtgt tttagtatt tgtgtg 37
 <210> 51
 20 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido de GST–Pi humana M13
 25 <400> 51
 tgtaaaacga cggccagtgt ttttagtata tgtgg 35
 <210> 52
 <211> 499
 <212> ADN
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 52

```
tgcagatcac ctaagggtcag gagttcgaga ccagcccggc caacatgggtg aaaccccgtc 60
tctactaaaa atacaaaaat cagccagatg tggcacgcac ctataattcc acctactcgg 120
gaggctgaag cagaattgct tgaacccgag aggcggagggt tgcagtgagc cgccgagatc 180
gcgccactgc actccagcct gggccacagc gtgagactac gtcataaaat aaaataaaat 240
aacacaaaat aaaataaaat aaaataaaat aaaataaaat aataaaaataa aataaaaataa 300
aataaaaataa aataaaaataa agcaatttcc tttcctctaa gcggcctcca cccctctccc 360
ctgccctgtg aagcgggtgt gcaagctccg ggatcgcagc ggtcttaggg aatttccccc 420
cgcgatgtcc cggcgcgcca gttcgtctgc cacttctgc tgcggtctc ttcctgctgt 480
ctgtttactc cctaggccc 499
```

<210> 53

<211> 316

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 53

```
gggacctggg aaagagggaa aggccttccc ggcagctgc gcggcgactc cggggactcc 60
agggcgcccc tctgcggccg acgcccgggg tgcagcggcc gccggggctg gggccggcgg 120
gagtccgcgg gacctccag aagagcggcc ggcgcctga ctcagcactg gggcggagcg 180
gggcgggacc accottataa ggctcggagg ccgcgaggcc ttcgctggag tttcgcgcgc 240
gcagtcttcg ccaccagtga gtacgcgcgg cccgcgtccc cggggatggg gctcagagct 300
cccagcatgg ggccaa 316
```

<210> 54

<211> 603

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 54

```
cagcatcagg cccgggctcc cggcagggct cctcgcccac ctcgagaccc gggacggggg 60
cctagggggac ccaggacgtc ccagtgccg ttagcggctt tcagggggcc cggagcgcct 120
cggggaggga tgggaccccg ggggcgggga gggggggcag gctgcgctca ccgcgccttg 180
gcatectccc cggggtcca gcaaactttt ctttgttcgc tgcagtgcgc ccctacaccg 240
tggtctatth cccagttcga ggtaggagca tgtgtctggc aggggaaggga ggcaggggct 300
ggggctgcag cccacagccc ctgcgccacc cggagagatc cgaaccccct tatecctccg 360
tcgtgtggct tttaccccg gctccttcc tgttccccgc ctctcccgcc atgectgtc 420
ccgcgccag tgttgtgtga aatcttcgga ggaacctgtt tacctgttcc ctccctgcac 480
tcctgacccc tccccgggtt gctgcgaggc ggagtgcgcc cgggtcccac atctcgtact 540
tctccctccc cgcaggccgc tgcgcggccc tgcgcatgct gctggcagat cagggccaga 600
get 603
```

<210> 55

15 <211> 266

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 55

```
gctctgagca cctgctgtgt ggcagtctct catccttcca cgcacatcct ctteccctcc 60
tcccaggctg gggctcacag acagccccct ggttggccca tcccagtgga ctgtgtgttg 120
atcaggcgcc cagtcacgcg gcctgtctcc ctccacccaa cccaggggct ctatgggaag 180
gaccagcagg aggcagccct ggtggacatg gtgaatgacg gcgtggagga cctccgctgc 240
aaatacatct ccctcatcta caccaa                266
```

<210> 56

5 <211> 287

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 56

```
tccccctgct ctcagcatat gtggggcgcc tcagtgcccg gcccaagctc aaggccttcc 60
tggcctcccc tgagtacgtg aacctcccca tcaatggcaa cgggaaacag tgaggggttg 120
ggggactctg agcgggaggg agagtgttgc ttctttctc caggaccaat aaaatttcta 180
agagagctac tatgagcact gtgtttcctg ggacggggct taggggttct cagcctcgag 240
gtcgggtggga gggcagagca gaggactaga aaacagctcc tccagca                287
```

10 <210> 57

<211> 524

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 57

```
ataaaataaa ataaaataaa ataaagcaat ttcctttcct ctaagcggcc tccaccctcc 60
tcccctgccc tgtgaagcgg gtgtgcaagc tccgggatcg cagcggctct aggaatttc 120
cccccgcgat gtcccggcgc gccagttcgc tgcgcacact tcgctgcggt cctcttcctg 180
ctgtctgttt actccctagg ccccgctggg gacctgggaa agaggggaaag gcttccccgg 240
ccagctgcgc ggcgactccg gggactccag ggcgccctc tgcggccgac gcccggggtg 300
cagcggccgc cggggctggg gccggcgagg gtccgcggga ccctccagaa gagcggccgg 360
cgccgtgact cagcactggg gcggagcggg gcgggaccac ccttataagg ctccgaggcc 420
gcgaggcctt cgctggagtt tcgccgcgcg agtcttcgcc accagtgagt acgcgcggcc 480
cgcgtccccg gggatggggc tcagagctcc cagcatgggg ccaa                524
```

15

<210> 58

<211> 524

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20 <400> 58

```

ataaaataaaa ataaaataaaa ataaagtaat tttttttttt ttaagtgggt tttatttttt 60
ttttttgttt tgtgaagtgg gtgtgtaagt tttgggattg tagtggtttt aggggaatttt 120
tttttgtgat gtttttgtgt gttagtgtgt tgtgtatatt ttgttgtggt tttttttttg 180
ttgtttgttt attttttagg ttttgttggg gatttgggaa agagggaaaag gtttttttgg 240
ttagttgtgt ggtgattttg gggatttttag ggtgtttttt tgtggttgat gtttgggggtg 300
tagtggttgt tgggggttggg gttggtggga gtttgtggga ttttttagaa gagtgggttg 360
tgttgtgatt tagtattggg gtggagtggg gtgggattat ttttataagg tttggagggt 420
gtgaggtttt tgttggagtt ttgttgttgt agtttttgtt attagtgagt atgtgtgggt 480
tgtgtttttg gggatggggg ttagagtttt tagtatgggg ttaa 524

```

<210> 59

<211> 524

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 59

```

ataaaataaaa ataaaataaaa ataaagtaat tttttttttt ttaagcgggt tttatttttt 60
ttttttgttt tgtgaagcgg gtgtgtaagt ttcgggatcg tagcggtttt aggggaatttt 120
ttttcgcgat gtttcggcgc gttagttcgt tgcgtatatt tcgttcgggt tttttttttg 180
ttgtttgttt attttttagg tttcgttggg gatttgggaa agagggaaaag gtttttttcgg 240
ttagttgcgc ggcgatttcg gggatttttag ggcgtttttt tgcggtcgac gttcgggggtg 300
tagcggtcgt cgggggttggg gtcggcgagg gttcgcggga ttttttagaa gagcgggtcgg 360
cgtcgtgatt tagtattggg gcggagcggg gcgggattat ttttataagg ttcggagggtc 420
gcgaggtttt cgttggagtt tcgtcgtcgt agttttcgtt attagtgagt acgcgcgggt 480
cgcgttttcg gggatggggg ttagagtttt tagtatgggg ttaa 524

```

REIVINDICACIONES

1. Un ensayo de diagnóstico o de pronóstico para el cáncer de próstata en un sujeto, dicho cáncer de próstata caracterizado por metilación anormal de la citosina en el sitio +2 dentro del gen para la glutatión S-transferasa humana (GST) Pi, en donde dicho ensayo comprende las etapas de:
 - 5 (i) aislar el ADN de dicho sujeto, y
 - (ii) determinar la presencia de metilación anormal de la citosina en dicho sitio dentro de la región del gen para la GST-Pi humana definido por (e inclusive de) los sitios CpG -43 a +55.
- 10 2. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde antes de la etapa de determinación, se trata el ADN aislado de tal manera que las citosinas no metiladas se convierten en uracilo u otro nucleótido capaz de formar un par de bases con adenina mientras que las citosinas metiladas permanecen sin cambios o se convierten en un nucleótido capaz de formar un par de bases con la guanina.
- 15 3. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el tratamiento del ADN aislado implica hacer reaccionar el ADN aislado con bisulfito.
4. El ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la etapa de determinación implica la hibridación selectiva de una(s) sonda(s) de oligonucleótido / polinucleótido / ácido péptido-nucleico (PNA).
5. El ensayo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicación 1 a 4, en donde dicho ADN se aísla a partir de células de tejido, sangre (incluyendo suero y plasma), semen, orina o linfa.
6. El ensayo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la etapa (ii) de dicho ensayo comprende las etapas de:
 - 20 (a) exponer dicho ADN aislado a los reactivos y condiciones para las amplificaciones de una región objetivo del gen para la GST-Pi humana y/o sus secuencias de flanqueo reguladoras que incluyen dicho sitio en el cual ocurre la metilación anormal de citosina característica de cáncer de próstata, siendo la amplificación selectiva ya que sólo se amplifica la región objetivo si dicho sitio en el cual ocurre la metilación anormal de citosina está metilado, y
 - (b) determinar la presencia de ADN amplificado,
- 25 en donde la etapa de amplificación (a) se utiliza para amplificar una región objetivo dentro de la región del gen para la GST-Pi humana definida por (e inclusive de) los sitios CpG -43 a +55, y
- en donde antes de la etapa de amplificación (a) se trata el ADN aislado de tal manera que las citosinas no metiladas se convierten en uracilo u otro nucleótido capaz de formar un par de bases con adenina, mientras que las citosinas metiladas permanecen sin cambios o se convierten en un nucleótido capaz de formar un par de bases con la guanina.
- 30 7. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la etapa de amplificación implica la amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), preferiblemente utilizando un cebador inverso que incluye guanina en al menos un sitio por lo que, después de la hibridación del cebador inverso con el ADN tratado, dicha guanina o bien formará un par de bases con una citosina metilada (u otro nucleótido al cual ha sido convertida la citosina metilada a través de dicho tratamiento) si está presente, o formará una falta de correspondencia con uracilo (o otro nucleótido al cual ha sido convertido la citosina no metilada a través de dicho tratamiento), y opcionalmente, dicha amplificación
- 35 mediante PCR utiliza un cebador directo que incluye citosina en al menos un sitio (s) que corresponde a los nucleótidos de citosina que están anormalmente metilados en el ADN de un sujeto con la enfermedad o condición que se está analizando, en donde dichos cebadores son, por ejemplo , de 12 a 30 nucleótidos de longitud.
- 40 8. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 7, en donde los cebadores se seleccionan con el fin de hibridar con una secuencia dentro de la región objetivo que incluye dos a cuatro nucleótidos de citosina que están anormalmente metilados en el ADN de un sujeto con cáncer de próstata que está siendo analizando.
9. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la etapa de amplificación implica la amplificación mediante PCR utilizando pares de cebadores que consisten de un cebador directo e inverso seleccionado de cada uno de los siguientes grupos:
 - 45 Cebador directo CGCGAGGTTTTCGTTGGAGTTTCGTCGTC (SEQ ID NO: 1)
 - Cebadores inversos TCCCATCCCTCCCCGAAACGCTCCG (SEQ ID NO: 8).

FIGURA 1

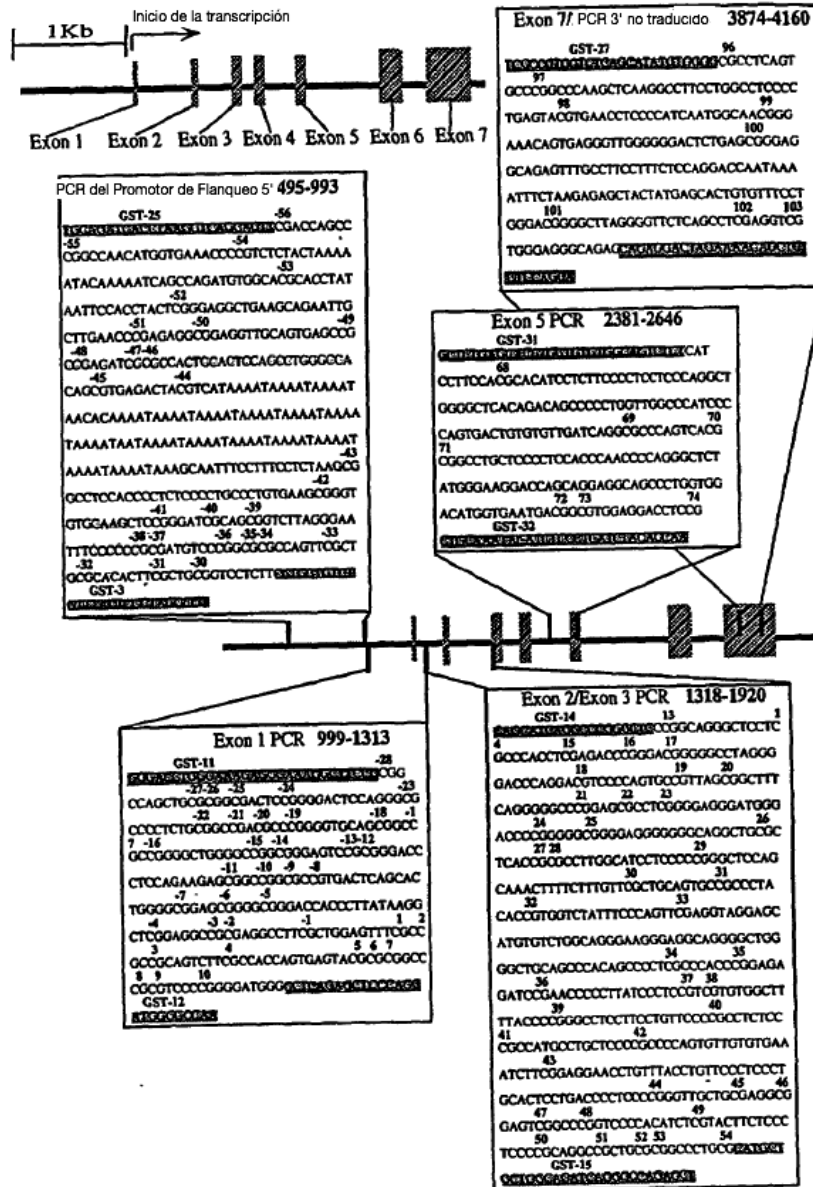


Figura 2 Región Secuencia Ariba de Metilación Diferencial en Cáncer de Próstata

ATAAATAAAA ATAAATAAAA ATAAAGCAAT TTCCTTTTCCT CTAAGCGGCC TCCACCCCTC TCCCTGCCC TGTGAAGCGG -355
ATAAATAAAA ATAAATAAAA ATAAAGTAAT TTTTTTTTTT TTAAGTGTT TTTATTTTTT TTTTGTGTT TGTGAAGTGG B-U
ATAAATAAAA ATAAATAAAA ATAAAGTAAT TTTTTTTTTT TTAAGCGGT TTTATTTTTT TTTTGTGTT TGTGAAGCGG B-M

-42
-43

GTGTCGAAGC TCCGGGATCG CAGCGGTCTT AGGGAATTTT CCCC CGCGAT GTCCCGCGC GCCAGTTCGC TCGGCACACT -275
GTGTGAAGT TTTGGGATG TAGTGTTT AGGGAATTT TTTTGTGAT GTTTGTGTT GTTAGTTGT TGTGTATAT B-U
GTGTGAAGT TTCGGGATCG TAGCGGTTTT AGGGAATTT TTTTCGCGAT GTTTCGCGC GTTAGTTCTGT TCGGTATAT B-M

CGPS-5 YGGTTTT AGGGAATTT TTTTCGC>CGPS-6 YGGYGY GTTAGTTGT TGYGTATAT
CGPS-11 GGGAATTT TTTTCGCGAT GTTYGGCGC>

-31 -30
TCGCTGCGGT CCTCTTCCG CTGTCTGTTT ACTCCCTAGG CCCC GCTGGG GACCTGGGAA AGAGGGAAG GCTTCCCCGG -195
TTGTTGTTGG TTTTGTGTTT TTTTGTGTTT ATTTTGTAGG TTTTGTGTTG GATTTGGAA AGAGGGAAG GTTTTGTGG B-U
TCGTTGCGGT TTTTGTGTTT TTTTGTGTTT ATTTTGTAGG TTTTCGTTGG GATTTGGAA AGAGGGAAG GTTTTGTGG B-M

-28
-29

-27-26-25 -24
CCAGTTCGCG GCGACTCCG GGGACTCCAG GCGGCCCTC TCGGCCGAC GCGCGGCTG CAGCGCCGC CGGGGTGGG -115
TTAGTTGTGT GGTGATTTG GGGATTTAG GGTGTTTTT TGTGTTGAT GTTTGGGTTG TAGTGGTTGT TGGGTGGG B-U
TTAGTTGCGC GCGATTTTC GGGATTTAG GCGTTTTTT TCGGTTGAC GTTCGGGTTG TAGCGGTCGT CGGGGTGGG B-M

<GCG CCRCTAAAC CCCTAAATC CCRC CGPS-7 < GCTG CAARCCCCAC ATCRCCARCA RCCCCA CGPS-8
<G CCGCTAAAGC CCCTAAATC CCRCAAA CGPS-12 <GCCARCA GCCCAACCC

TC>

Figura 2 (Continuación)

-15	-14	-13-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	
GCGGCGGGA	GTCCGCGGA	CCCTCCAGAA	GAGCGGCCGG	CGCCGTGACT	CAGCACTGGG	GCGGAGCGGG	GCGGAGCGGG	GCGGAGCGGG	GCGGAGCGGG	-35
GTTGGTGGGA	GTTTGTGGGA	TTTTTTAGAA	GAGTGGTTGG	TGTTGTGATT	TAGTATTGGG	GTTGGAGTGGG	GTTGGAGTGGG	GTTGGAGTGGG	GTTGGAGTGGG	B-U
GTCGCGCGGA	GTTCCGCGGA	TTTTTTAGAA	GAGCGGTCCG	CGTCGTGATT	TAGTATTGGG	GCGGAGCGGG	GCGGAGCGGG	GCGGAGCGGG	GCGGAGCGGG	B-M

<GCCGCCCT CAARCCCT AAAAAATCTT CTC CGPS-9									
CAGCCRCCT CAA CGPS-13									

-4	-3	-2	-1	>	1	2	3	4	5	6	7
CCTTATAAGG	CTCGAGGCC	GCGAGGCCCT	CGCTGGAGTT	TCGCCGCCGC	AGTCTTCGCC	ACCACTGAGT	ACGCCGGCC	ACGCCGGCC	ACGCCGGCC	ACGCCGGCC	+46
TTTTATAAGG	TTTGGAGGT	GTGAGGTTTT	TGTTGGAGTT	TGTTGGTTGT	AGTTTTTGT	ATTAGTGT	ATTAGTGT	ATTAGTGT	ATTAGTGT	ATTAGTGT	B-U
TTTTATAAGG	TTCCGAGGTC	GCGAGGTTTT	CGTTGGAGTT	TCGTGTCGT	AGTTTCGTT	ATTAGTGT	ACGCCGGGT	ACGCCGGGT	ACGCCGGGT	ACGCCGGGT	B-M

CGPS-1 C GCGAGGTTTT CGTTGGAGTT TCGTCGTC> CGPS-2 CGTT ATTAGTGT ACGCCGGGT											
---	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

8	9	10	
CGCGTCCCG	GGGATGGGC	TCAGAGCTCC	CAGCATGGGG CCAA +90
TGTGTTTTG	GGGATGGGT	TTAGAGTTTT	TAGTATGGGG TTAA B-U
CGCGTTTTG	GGGATGGGT	TTAGAGTTTT	TAGTATGGGG TTAA B-M

C>

Figura 3A Estado de Metilación de Sitios Individuales en el Gen para la GST-Pi

sitio	LN	Du	PC3	PC3 M	PC3 MM	2AN	BN CN	2AC	BC	CC	DC	XC	WC	Pr
-28	++++	-	+	++	++	-	-	-	++	+	++	+++	++	-
-27	++++	-	+	++	++	-	-	-	+	+	++	+++	+	-
-26	++++	-	+	++	++	-	-	-	+	+	++	+++	++	-
-25	++++	-	+	++	++	-	-	-	+	++	++	+++	++	-
-24	++++	-	+	++	++	-	-	-	+	++	++	+++	+++	-
-23	++++	-	+	+	+	-	-	-	++	++	++	-	+++	-
-22	++++	-	++	+	+	-	-	-	++	+	++	-	+++	-
-21	++++	-	+	-	-	-	-	-	++	++	+++	+++	++	-
-20	++++	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	-	+	-
-19	++++	-	++	-	-	-	-	-	+	++	++	+	+	-
-18	++++	-	++	+	++	-	-	-	++	++	++	+++	++	-
-17	++++	-	+	+	++	-	-	-	++	++	++	+++	+++	-
-16	++++	-	++	+	++	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	-
-15	++++	-	+	+	++	-	-	-	++	++	+++	+++	+++	-
-14	++++	-	-	+	+	-	-	-	+	++	++	-	+	-
-13	++++	-	+	+	+++	-	-	-	B	B	B	++	+	-
-12	++++	-	+	++	++	-	-	-	B	B	B	+++	+	-
-11	++++	-	++	++	++	-	-	-	+	++	++	+++	+++	-
-10	++++	-	++	++	++	-	-	-	++	++	+++	+++	++	-
-9	++++	-	++	++	++	-	-	-	++	++	++	+++	+++	-
-8	++++	-	++	+	++	-	-	-	++	+	+++	+++	++	-
-7	++++	-	++	++	++	-	-	-	++	++	+++	+++	+++	-
-6	++++	-	++	++	++	-	-	-	++	++	+++	+++	++	-
-5	++++	-	++	++	+++	-	-	-	++	++	+++	+++	+++	-
-4	++++	-	++	++	+++	-	-	-	++	++	+++	+++	+++	-
-3	++++	-	++	++	++	-	-	-	+++	++	+++	+++	+++	-
-2	++++	-	++	++	B	-	-	-	+++	++	+++	+++	+++	-
-1	++++	-	++	+	B	-	-	-	++	++	++	+++	++	-

Figura 3A (continuación)

1	++++	-	++	B	B	-	-	-	++	++	+++	-
2	++++	-	++	B	B	-	-	-	++	++	+++	-
3	++++	-	++	B	B	-	-	-	++	++	+++	-
4	++++	-	++	B	B	-	-	-	++	++	+++	-
5	++++	-	+++	B	B	-	-	-	B	++	+++	-
6	++++	-	+++	B	B	-	-	-	B	+++	+++	-
7	++++	-	+++	B	B	-	-	-	B	+++	+++	-
8	++++	-	++	B	B	-	-	-	B	++	+++	-
9	++++	-	++	B	B	-	-	-	B	++	+++	-
10	++++	-	++	B	B	-	-	-	B	++	+++	-
11												
12												
13	++++	+	+	+++	+++	-	-	-	+++	+++	-	
14	++++	+	+	+++	+++	-	-	-	+++	+++	-	
15	++++	+	+	+++	+++	-	-	-	+++	+++	-	
16	++++	+	+	+++	+++	-	-	-	++	+++	-	
17	++++	+	+	++	++	-	-	-	++	+++	-	
18	++++	+	+	++	+	-	-	-	+++	+++	-	
19	++++	+	+	+	++	-	-	-	++	+++	-	
20	++++	+	+	+	+	-	-	-	++	+++	-	
21	++++	B	B	+	+	-	-	-	++	+++	-	
22	++++	B	B	+	+	-	-	-	++	+++	-	
23	++++	B	B	+	+	-	-	-	++	+++	-	
24	+++	B	B	+	+	-	-	-	++	+	-	
25	-	B	B	+	+	-	-	-	++	+	-	
26	++++	B	B	++	B	-	-	-	+++	+++	-	
27	++++	B	B	+++	B	-	-	-	+++	+++	-	
28	++++	B	B	+++	B	-	-	-	+++	+++	-	
29	++++	B	B	+++	B	-	-	-	B	+++	-	
30	++++	B	B	B	B	-	-	-	+++	B	-	
31	++++	B	B	B	B	-	-	-	+++	B	-	
32	B	B	B	B	B	-	-	-	+++	B	-	
33	++++	B	B	+++	B	-	-	-	+++	+++	-	

Figura 3A (continuación)

[illegible]

Figura 3B Estado de Metilación de Sitios Individuales en el Gen para la GST-Pi

Sitio	Próstata Normal (15)	PC-3 (10)	LNCaP (7)	BC (9)	CC (4)	DC (10)	Sangre (13)	Cerebro (6)	Bazo (6)	Hígado (6)	Músculo liso (6)	Pulmón (5)	Médula ósea (5)	Páncreas (6)	Corazón (3)
-56	+++	+++	++++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++	++++
-55	++++	+	++++	++	+	+++	++++	++++	++++	++	+++	++	++++	+++	++++
-54	++	-	++++	++	+	++	++++	+++	++	++	++++	++	++++	+++	++++
-53	+++	-	+++	++++	+	+	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	++++
-52	++	+	++++	+	-	+	++++	+	++	+	-	+	++	++	++++
-51	+	-	++++	++	++	+++	++++	++	++	-	+++	++++	++++	++	++++
-50	++	++	++++	++	++	++++	++++	++++	+++	++	+	++++	+++	++	++++
-49	++	+	++++	+	B	+++	++++	++	++	+	-	++++	++++	++	-
-48	+	+++	++++	++	++	++++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
-47	+	++	++++	+++	++	+++	+++	++	+++	+	-	+++	++++	+	+
-46	++	++	++++	+++	++	++++	++++	++	++	+	-	+++	+	++	+
-45	++	-	++++	+	++	++++	++++	++	++	+	-	+++	++	+	-
-44	++	-	++++	+	++	+++	++++	+	++	+	-	-	+	++	+++
-43	-	-	++++	+++	++++	++++	+	+	-	-	-	+	-	-	-
-42	-	-	++++	++++	++++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-41	-	-	++++	+++	++++	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-40	-	-	++++	++++	++++	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-39	-	-	++	++++	++++	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-38	-	-	+++	++++	++++	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-37	-	-	++++	+++	++++	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-36	-	-	++++	++	+	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-35	-	+	++++	++++	++++	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-34	-	-	++++	++++	++++	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-33	-	p	++++	++++	++++	++++	++++p	-	-	-	-	-	-	-	-
-32	-	-	B	+++	++++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-31	-	-	B	++++	++++	++++	-	-	-	-	-	-	+	-	-
-30	-	-	B	+++	++++	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 3B (continuación)

-25	*
-24	*
-23	*
-22	*
-21	*
-20	*
-19	*
-18	*
-17	*
-16	*
-15	*
-14	*
-13	*
-12	*
-11	*
-10	*
-9	*
-8	*
-7	*
-6	*
-5	*
-4	*
-3	*
-2	*
-1	*
1	*
2	**
3	**
4	**
5	+
6	+
7	*
8	*
9	*
10	*

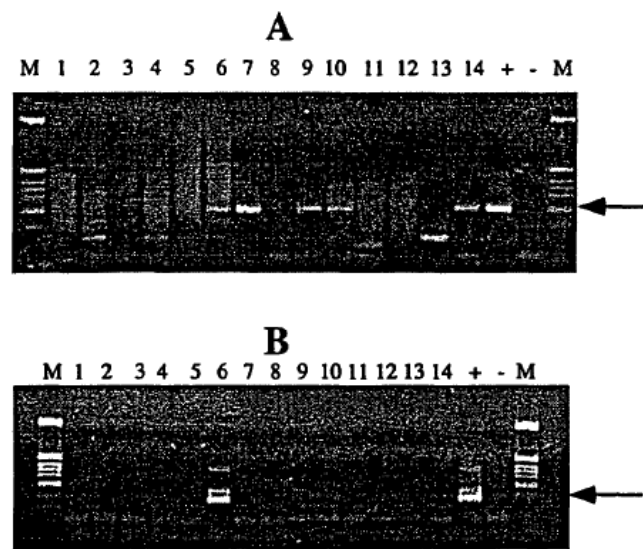
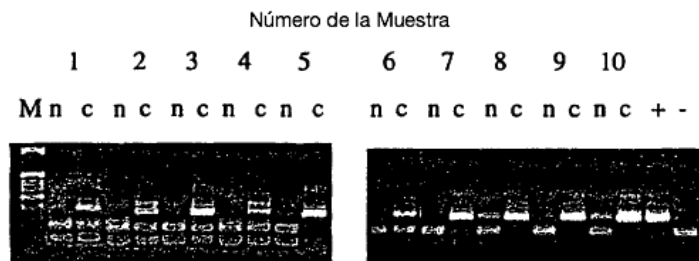


FIGURA 4A



Muestra	Tejido	Gleason	% de Metilación por PCR no rica en CG
1	Normal	N/A	-
	Cáncer	3+3	++++
2	Normal	N/A	-
	Cáncer	3+5	++
3	Normal	N/A	-
	Cáncer	3+3	++
4	Normal	N/A	-
	Cáncer	3+5	-
5	Normal	N/A	-
	Cáncer	2+2	++
6	Normal	N/A	-
	Cáncer	3+3	-
7	Normal	N/A	-
	Cáncer	2+3	++
8	Normal	N/A	-
	Cáncer	3+3	++
9	Normal	N/A	-
	Cáncer	2+3	++++
10	Normal	N/A	-
	Cáncer	?	++

FIGURA 4B

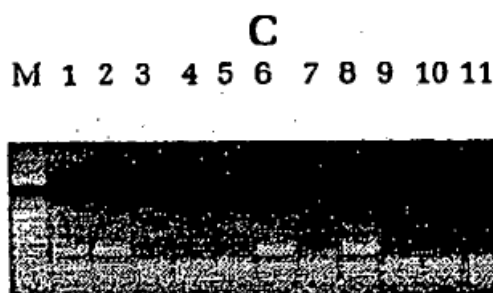
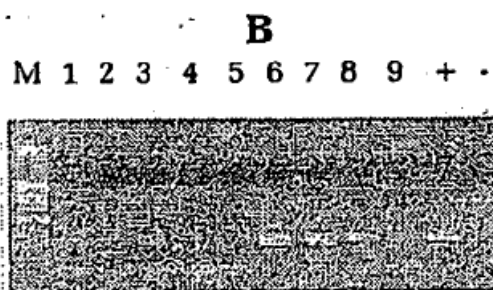
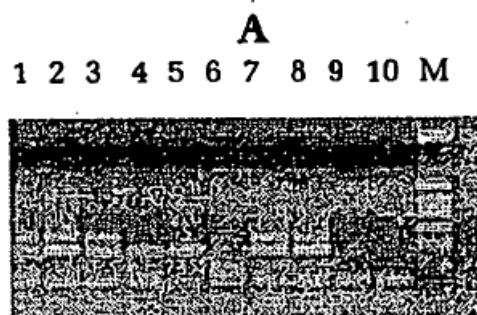


FIGURA 4C

Figura 5

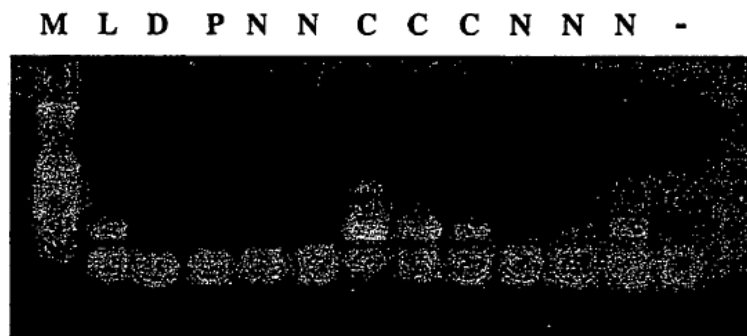


Figura 6

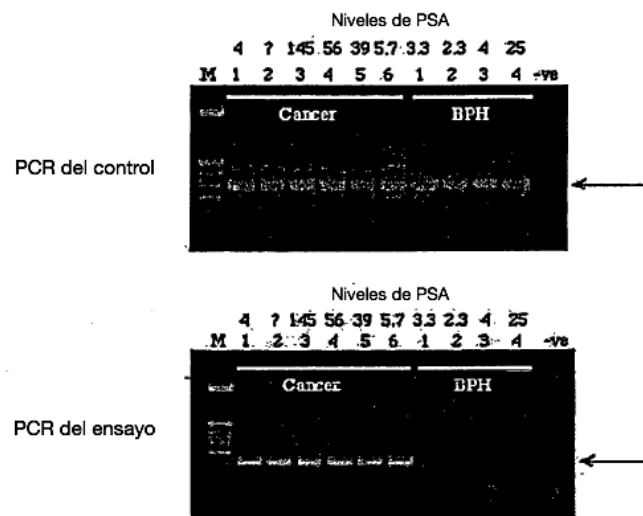


Figura 7A

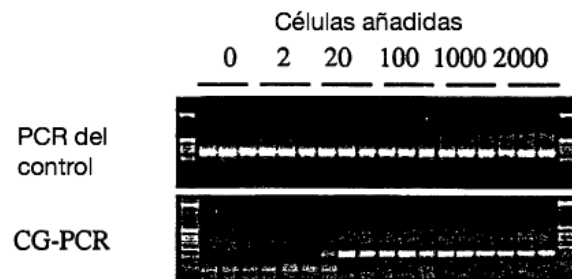


Figura 7B

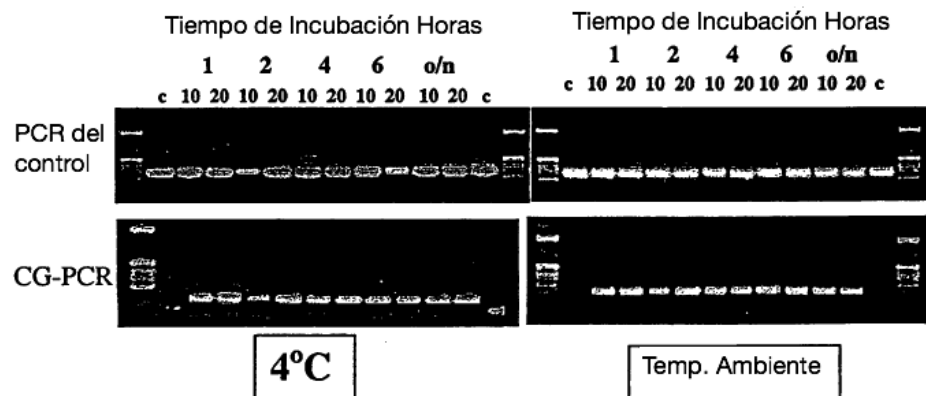


Figura 8

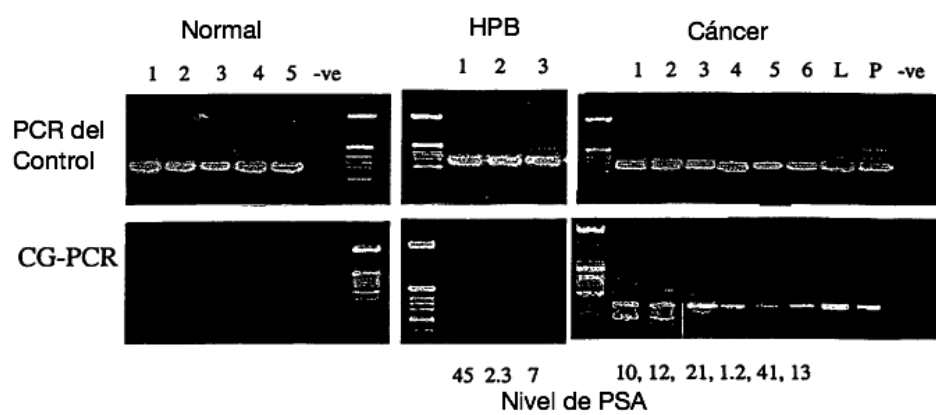


Figura 9

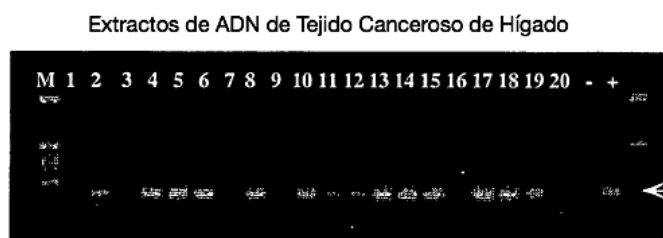


Figura 10

