

T-16/56

HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES
GRANADA

T
16
/05

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 1-3-96
ENTRADA NUM. 465

**"EL ANTIGENO TUMORAL MAGE-1: ESTUDIO DE SU
EXPRESION Y REGULACION GENETICA"**

Trabajo presentado por D. ALFONSO SERRANO GARBALLO, para optar al
grado de Doctor en Ciencias.

Febrero de 1996

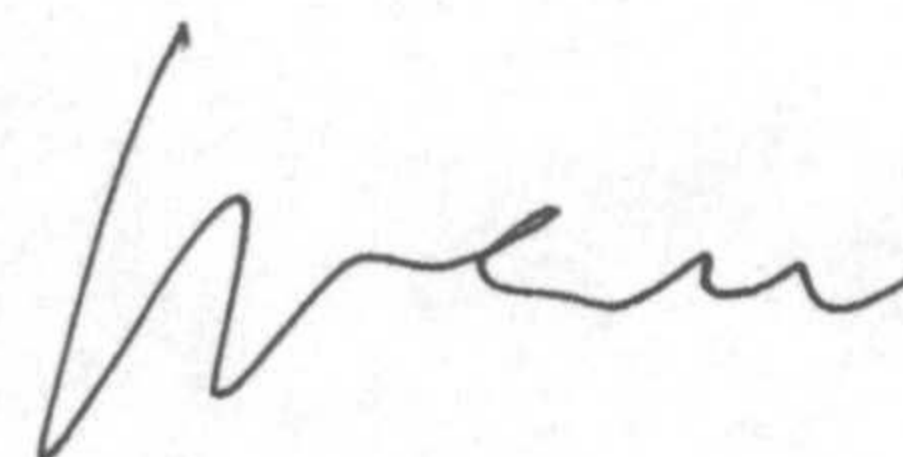
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento <u>019689226</u>
Nº Copia <u>12174165X</u>

UNIVERSIDAD DE GRANADA
22 FEB. 1996
COMISION DE DOCTORADO

D. FRANCISCO RUIZ-CABELLO OSUNA, DOCTOR EN FARMACIA Y FACULTATIVO ESPECIALISTA DE AREA DEL SERVICIO DE ANALISIS CLINICOS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES DE GRANADA.

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado: "EL ANTIGENO MAGE-1: ESTUDIO DE SU EXPRESION Y REGULACION GENETICA", ha sido realizado bajo mi dirección por D. ALFONSO SERRANO GARBALLO, para optar al título de Doctor en Ciencias.

Y para que conste se firma el presente certificado en Granada, a 20 de Febrero de 1996.



Francisco Ruiz-Cabello

D. FEDERICO GARRIDO TORRES-PUCHOL, CATEDRÁTICO DE INMUNOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, JEFE DE SERVICIO DE INMUNOLOGÍA Y ANÁLISIS CLÍNICOS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES DE GRANADA.

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado: "EL ANTIGENO TUMORAL MAGE-1: ESTUDIO DE SU EXPRESIÓN Y REGULACIÓN GENÉTICA", ha sido realizado bajo mi dirección por D. ALFONSO SERRANO GARBALLO, para optar al grado de Doctor en Ciencias.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Granada, a 20 de Febrero de 1996.

Federico Garrido

A mis padres, por toda una vida de sacrificio.



AGRADECIMIENTOS

* Deseo que mis primeros agradecimientos sean para quien ha sido durante estos años mi maestro y guía. Al Dr. Ruiz Cabello por haber sido siempre un estímulo y por su confianza. Gracias Paco.

* Gracias al Dr. Federico Garrido por haberme permitido la realización de esta Tesis, poniendo a mi alcance todos los medios posibles.

* Quiero agradecer muy especialmente la labor técnica y humana de apoyo a este trabajo. Gracias a M^{ra} Carmen Amezcua, a Inmaculada Delgado y a M^{ra} José Guadix.

* Y finalmente gracias a todos mis compañeros/as: Adjuntos, Residentes, Becarios, personal de enfermería y técnico, por haber compartido estos años.

† Este trabajo está dedicado, a título póstumo, a Adolfo
Zorzano Cózar, quien fue mi compañero de estudio durante los
años de universidad.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
- ANTIGENOS TUMORALES.....	2
. ANTIGENOS TUMORALES RECONOCIDOS POR CTLs.....	4
. NATURALEZA DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS POR LINFOCITOS T ← SOBRE TUMORES.....	10
1. ¿Cómo son reconocidos estos antígenos?.....	10
2. Formas de aparición de nuevos antígenos sobre las células tumorales.....	13
. Mutación de un gen.....	13
. Activación anormal de un gen.....	14
- EL ANTIGENO TUMORAL MAGE-1.....	16
. EL GEN MAGE-1.....	16
1. Descubrimiento y estructura.....	16
2. Antígenos que codifica.....	18
3. Expresión del gen Mage-1 en tejidos tumorales.....	19

. MAGE-1 PERTENECE A UNA FAMILIA DE GENES ESTRECHAMENTE RELACIONADOS (MAGE).....	21
1. Características de los diferentes miembros de la familia MAGE.....	22
2. Localización cromosómica de la familia MAGE.....	25
3. Expresión tumoral de los diferentes miembros de la familia MAGE.....	26
- LA PROTEINA MAGE-1.....	28
1. Características de la proteína.....	28
2. Localización celular de la proteína.....	30
- REGULACION TRANSCRIPCIONAL DEL MAGE-1.....	32
1. Mecanismos transcripcionales y regulación transcripcional.....	32
2. La región promotora del gen Mage-1.....	39
- IMPORTANCIA DE LA PROTEINA MAGE-1.....	43

OBJETIVOS.....	46
MATERIAL Y METODOS.....	49
1.CLONACION DE LA FASE ABIERTA DE LECTURA DEL GEN MAGE-1.....	50
1.1.OBTENCION DEL INSERTO.....	51
1.2.LIGACION VECTOR/INSERTO.....	56
1.3.TRANSFORMACION BACTERIANA.....	57
1.4.CONFIRMACION DE LA TRANSFORMACION BACTERIANA Y SECUENCIACION CONFIRMATIVA DEL INSERTO MAGE-1.....	60
2.PRODUCCION A GRAN ESCALA DE LA PROTEINA RECOMBINANTE MAGE-1.....	66
2.1.INDUCCION.....	66
2.2.PRODUCCION DE LA PROTEINA RECOMBINANTE MAGE-1.....	67
3.OBTENCION DE ANTISUERO FRENTE A LA PROTEINA RECOMBINANTE MAGE-1.....	73
3.1.INMUNIZACION CON PROTEINA RECOMBINANTE MAGE-1.....	73

3.2.OBTENCION DEL ANTISUERO.....	74
3.3.LIMPIEZA DEL ANTISUERO DE IMNUGLOBULINAS NO ESPECIFICAS Y REACTIVAS FRENTE A GST.....	75
3.4.PURIFICACION, A PARTIR DEL SUERO DE AVE DEL ANTISUERO ESPECIFICO.....	77
4.ENSAYOS REALIZADOS CON EL ANTISUERO.....	81
4.1.WESTERN BLOT.....	81
4.2.INMUNOPRECIPITACION.....	83
4.3.INMUNOHISTOQUIMICA.....	87
5.EXPRESION DE LA PROTEINA RECOMBINANTE MAGE-1 ENSISTEMA EUCARIOTA (BACULOVIRUS).....	90
5.1.SUBCLONACION DE LA REGION CODIFICANTE DEL GEN MAGE-1.....	90
5.2.OBTENCION Y PURIFICACION DE GRAN CANTIDAD DE PLASMIDO RECOMBINANTE CIRCULAR EN GRADIENTE DE CLCs/BrEt.....	91
5.3.OBTENCION DE VIRUS RECOMBINANTE.....	94
5.4.OBTENCION DE EXTRACTOS CELULARES CON PROTEINARECOMBINANTE.....	102

6.DESCRIPCION Y CULTIVO DE LINEAS CELULARES.....	104
7.TRATAMIENTO DE LAS LINEAS CON DIFERENTES AGENTES QUIMICOS.....	105
8.DETERMINACION DE LA EXPRESION DEL GEN MAGE-1 EN LAS DIFERENTES LINEAS.....	106
8.1.EXTRACCION DEL ARN TOTAL.....	106
8.2.SINTESIS DE ADNc.....	107
8.3.AMPLIFICACION ESPECIFICA DEL ADNc MAGE-1.....	109
8.4.AMPLIFICACION DE OTROS ADNc.....	110
9.DETERMINACION DEL INMUNOFENOTIPO DE LA LINEA K562.....	112
10.MEDIDA DE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA DE LA LINEA K562 POR INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA.....	113
11.ENSAYOS REALIZADOS CON EL ADN DE LAS DIFERENTES LINEAS.....	114
11.1.EXTRACCION DE ADN.....	114
11.2.ENSAYO DE SOUTHERN BLOT.....	115

11.3.DETERMINACION DE LA METILACION	
PUNTUAL EN EL PROMOTOR DE MAGE-1.....	120
11.4.TIPIFICACION GENOMICA DE LAS LINEAS	
K562A Y K562B.....	122
12.ENSAYO DE MOVILIDAD EN GELES DE RETARDO.....	126
12.1.PREPARACION DE LOS EXTRACTOS	
NUCLEARES.....	126
12.2.SONDAS UTILIZADAS.....	127
12.3.REACCION/ENSAYO DE MOVILIDAD.....	128
13.ENSAYO FUNCIONAL DEL PROMOTOR DE MAGE-1	
(REGION B'B).....	130
13.1.CONTRUCCION DEL PLASMIDO	
pMAGE-1luc80.....	130
13.2.CLONAGE Y OBTENCION DE GRAN	
CANTIDAD DEL PLASMIDO pMAGE-1luc80.....	132
13.2.ENSAYOS FUNCIONALES.....	132

RESULTADOS.....	136
- ESTUDIO DE LA PROTEINA RECOMBINANTE MAGE-1 EN SISTEMA PROCARIOTA.....	137
1. CLONACION DEL GEN MAGE-1 EN VECTOR DEEXPRESION.....	137
2. PRODUCCION DE LA PROTEINA RECOMBINANTE.....	138
. ANALISIS DE LOS SUEROS OBTENIDOS FRENTE A LA PROTEINA RECOMBINANTE MAGE-1.....	140
1. ANALISIS MEDIANTE WESTERN BLOT.....	140
2. ANALISIS MEDIANTE INMUNOPRECIPITACION.....	141
3. ANALISIS MEDIANTE INMUNHISTOQUIMICA.....	141
- ESTUDIO DE LA PROTEINA RECOMBINANTE EN SISTEMA DE EXPRESION EUCARIOTA.....	150
1. CLONACION DEL GEN MAGE-1 EN EL VECTOR VIRAL.....	150
a) Cotransfección del plásmido pBBHISAMage-1 y el ADN viral. Evidencia de la infección celular.....	151

b) Selección del virus recombinante.....	152
2. LOCALIZACION DE LA PROTEINA RECOMBINANTE.....	152
a) Transcripción de la proteína recombinante MAGE-1.....	153
b) Evidencia de la proteína recombinante MAGE-1.....	153
- EXPRESION DEL ANTIGENO MAGE-1 EN LALINEAK562.....	156
1. EXISTENCIA DE DOS VARIANTES DE LA MISMA LINEA.....	156
2. AMBAS VARIANTES SON LA MISMA LINEA.....	156
3. DIFERENCIAS ENTRE LAS DOS VARIANTES.....	158
4. DIFERENCIACION DE K562A MEDIANTE LOS MODULADORES ARAC, HEMINA Y PMA.....	159
- ESTUDIO DEL PROMOTOR DE MAGE-1 EN LINEAS DE DIFERENTE ORIGEN HISTOLOGICO.....	165

1. ESTUDIO A NIVEL DE METILACION.....	165
a) El efecto del agente desmetilante 5-Aza-2'-deoxiCitidina (DAC).....	165
b) Estudio mediante Southern blot del perfil de metilación del promotor de Mage-1.....	166
c) Estudio de metilación mediante PCR.....	168
2. ESTUDIO DE FACTORES TRNSCRIPCIONALES.....	171
3. ESTUDIO FUNCIONAL DEL PROMOTOR (REGION B'B).....	172
DISCUSION.....	183
CONCLUSIONES.....	202
BIBLIOGRAFIA.....	204



INTRODUCCION

ANTIGENOS TUMORALES.

El estudio de los antígenos tumorales ha constituido y constituye un reto para la inmunología, ya que el conocimiento de su naturaleza, así como su presencia, puede ayudar a comprender su importancia en el desencadenamiento de una respuesta inmune antitumoral efectiva.

El primer paso importante en la investigación de antígenos tumorales específicos se dio en 1943, cuando Ludwik Gross descubrió que se podían inmunizar ratones isogénicos contra un tumor desarrollado en un ratón de la misma cepa.

La presencia de antígenos específicos de tumor fue en principio demostrada sometiendo a los animales a fuertes dosis de carcinógenos químicos (Prehn y Main 1957), a virus oncogénicos (Klein y Klein 1964) o a radiación ultravioleta (Kripke 1974). Se observaba que estos tumores eran rechazados cuando se trasplantaban a un animal singénico que previamente había sido inmunizado contra el mismo tumor. También se observó que estos ratones aceptaban trasplantes de piel normal del mismo origen que el tejido tumoral, con lo cual se podía admitir que el rechazo se producía frente a antígenos específicos del tumor inducido. Estos antígenos fueron denominados de forma genérica Antígenos de Trasplante Específicos de Tumor (ATET).

El hecho de que los ratones aceptaran trasplantes isogénicos de piel normal fue fundamental, ya que el rechazo podía estar mediado por antígenos de trasplante,

generalmente por antígenos codificados por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). La presencia de estos antígenos fue lo que hizo fracasar los primeros intentos de demostrar la existencia de antígenos específicos de tumor, ya que se utilizaban animales genéticamente distintos. Sin embargo aún surgía la duda de si los individuos de una misma cepa eran totalmente idénticos, o si por el contrario podían existir algunas diferencias genéticas residuales. Estas sospechas fueron rebatidas al demostrarse que el propio animal en el que se había inducido originalmente el tumor podía ser inmunizado contra las células de su propio tumor.

Este fenómeno de rechazo, sin embargo, no se observaba jamás cuando se trataba de tumores espontáneos de ratón, los cuales no habían sido resultado de un tratamiento carcinogénico (Hewit y col. 1976). Años más tarde se demostró que el tratamiento de células tumorales de ratón por un agente carcinogénico provocaba la aparición de antígenos de rechazo fuertemente inmunógenos, a los que se les dio el nombre de **tum(-)**. Se observó que las variantes tumorales que portaban estos antígenos tum- inducían una inmunidad contra el tumor original, respuesta que se hacía extensible hacia tumores espontáneos. Esto indicaba que los antígenos tumorales, débiles, o no inmunógenos estaban ya presentes sobre la célula tumoral inicial (Van Pel y T. Boon 1982; Van Pel y col. 1983).

En el caso de los tumores humanos es más difícil establecer la existencia de ATET, ya que los experimentos de trasplante no son posibles. Sin embargo a lo largo de los últimos años diversos grupos han demostrado, utilizando una estrategia

diferente, la existencia de estos antígenos en tumores humanos.

ANTIGENOS TUMORALES HUMANOS RECONOCIDOS POR LINFOCITOS T CITOTOXICOS (CTLs).

Se sabe, desde hace aproximadamente dos décadas, que los fenómenos de rechazo tumoral pueden estar mediados por linfocitos T citotóxicos, que son capaces de producir la lisis de las células que portan el antígeno (Cerottini y col. 1970; Golstein y col. 1972). Por otra parte, Wagner y Röllingen 1973, mostraron que los linfocitos de ratón podían ser activados de forma específica "in vitro" contra ciertos tumores. A partir de aquí un gran número de clones estables de CTLs, dirigidos contra antígenos de rechazo tumoral, fueron obtenidos en el ratón (Brunner y col. 1980; Maryanski y col. 1982).

Los linfocitos de sangre periférica (PBLs) del paciente con cáncer contienen la fuente para el estudio "in vitro" de la respuesta inmunitaria antitumoral mediada por CTLs. En un primer análisis, inmediatamente después de la recolecta, estos PBLs no muestran ninguna actividad frente a las células tumorales del paciente, siendo necesaria una etapa de estimulación "in vitro", o de cultivo de los linfocitos del paciente en presencia de células tumorales autólogas irradiadas y de factores de crecimiento, tales como la interleucina-2 o la interleucina-4. A esta estimulación "in vitro" se la ha denominado MLTC (Cultivo Mixto Linfocito-Tumor). De esta forma

se demostró una actividad citolítica dirigida preferentemente contra células del tumor autólogo, en el caso de melanomas, cáncer de pulmón y de mama (Vose y Bonnard 1982).

Las poblaciones linfocitarias obtenidas en MLTC no tienen, sin embargo, una actividad absoluta frente a las células tumorales autólogas y no es extraño que lisen otras células diana autólogas o alogénicas, esto es debido a la heterogeneidad de la población que contienen. Además de la población de CTLs de diferentes especificidades, contienen células de un amplio espectro de citotoxicidad, tales como las células NK, o las células LAK (células "killer" activadas por linfocinas). Estas últimas células que pueden ser activadas por la simple presencia de IL-2, pueden ser distinguidas de la actividad CTL específica por su capacidad de lisar una línea alogénica como es la K562. Para solventar el problema de la pérdida de especificidad de las poblaciones linfocitarias obtenidas de los MLTC, diversos grupos aislaron clones de CTLs.

Algunos de estos clones lisaban células tumorales autólogas, pero no las células K562, células linfocitarias transformadas por el virus de Epstein-Barr, o los fibroblastos autólogos. Estos resultados fueron obtenidos en melanomas humanos, que tienen la ventaja de adaptarse más fácilmente a las condiciones de cultivo (Mukherji y McAlister 1983; De Vries y Spits 1984; Knuth y col. 1984; Hérin y col. 1987; Degiovanni y col. 1988), en linfomas (Zagury y col. 1983; Yssel y col. 1984) y en sarcomas (Slovin y col. 1986).

Los clones obtenidos presentaban especificidades diferentes, algunos clones reconocían varios tumores, siempre que fuesen del mismo origen histológico que el tumor autólogo (Slovin y col. 1986; Yssel y col. 1984), mientras que otros lisaban únicamente las células del tumor autólogo (Anichini y col. 1986; Hérin y col. 1987; Degiovanni y col. 1988).

Algunas células tumorales expresan en su superficie varios determinantes antigénicos distintos, éste es el caso de la línea de melanoma MZ2-MEL, frente a la cual se han obtenido varios clones de CTLs que son específicos de la línea. Probando su actividad frente a varios subclones fue posible clasificar estos CTLs en tres grupos diferentes (Hérin y col. 1987). El primer grupo reconocía el antígeno A que estaba presente en todos los subclones, el segundo grupo reconocía el antígeno B que se había perdido en algunos subclones, y el tercer grupo reconocía el antígeno C que únicamente estaba presente en el 5% de células de la línea inicial.

Según el principio de inmunoselección, es posible seleccionar una población celular que escape a la lisis por un CTL (Maryanski y Boon 1982). Tres clones de CTLs anti-A fueron utilizados en experiencias de inmunoselección sobre la línea MZ2-MEL (Van den Eynde y col. 1989), de esta forma las tres variantes que habían perdido el antígeno se revelaron resistentes a la lisis por el clon de CTL que había servido para su inmunoselección, pero permanecían sensibles frente a los otros dos clones anti-A. Esta inmunoselección permitió definir tres antígenos distintos (D, E y F) en el seno del grupo A. Un cuarto antígeno llamado A' fue definido mediante

un clon dirigido contra el antígeno A que no reconocía ninguno de los antígenos D, E ó F. Experiencias similares no permitieron definir otros componentes para los antígenos B y C.

En total fueron analizados 76 clones de CTLs dirigidos contra la célula MZ2-MEL y todos iban dirigidos contra los antígenos A', B, C, D, E ó F. El número de antígenos de rechazo expresados en la superficie de la célula MZ2-MEL era por tanto limitado.

Los estudios "in vitro" mostraron que se podían aislar, a partir de PBL de un paciente canceroso, CTLs que reconocían las células tumorales autólogas. Sin embargo podía ser que estos antígenos reconocidos fuesen artefactos debido a las condiciones de cultivo, ya que las células tumorales estaban establecidas bajo forma de líneas permanentes, y que por tanto la reactividad encontrada "in vitro" tuviese poca importancia "in vivo".

Slovin y sus colaboradores (1986), mostraron que un clon de CTL obtenido de un paciente aquejado de un sarcoma, reconocía no solamente la línea tumoral autóloga, sino también una muestra criopreservada del mismo tumor, por tanto, el antígeno reconocido sobre las células tumorales no había sido adquirido en el curso del cultivo.

En otros estudios se obtuvieron clones de CTLs, estimulados en MLTC, frente a una línea de melanoma adaptada a cultivo a partir de una metástasis tomada algún tiempo antes. De esta forma se identificaron dos antígenos enfrentando estos

clones de CTLs a diferentes subpoblaciones de la línea de melanoma (Degiovanni y col. 1988). Años mas tarde, varias nuevas metástasis aparecieron en el mismo paciente siendo retiradas por cirugía. Las células tumorales recolectadas fueron utilizadas en una experiencia de estimulación proliferativa de los CTLs aislados en el primer estudio. Los resultados indicaron que los dos antígenos identificados sobre la línea tumoral al principio, estaban también presentes sobre las muestras metastásicas tomadas mas tarde (Degiovanni y col. 1990). Parece, por tanto, que los antígenos identificados "in vitro" sobre la línea tumoral existían también sobre el tumor. Esto excluía la posibilidad de que estos antígenos sólo apareciesen como consecuencia de la adaptación a las condiciones de cultivo, o como consecuencia de cultivos de períodos de tiempo largos.

Una vez que se sabía que los determinantes antigénicos eran presentados por las células de la masa tumoral, surgía la duda de si las células del tumor eran accesibles "in vivo" a las células del sistema inmunitario y en particular a los linfocitos T citotóxicos. Varios investigadores han observado que los tumores sólidos son frecuentemente infiltrados por células mononucleares (Iochim 1979; Kaszubowski y col. 1980; Szeteras y Darcozy 1981).

Poppema y su grupo en 1983, observaron por medio de anticuerpos que las células mononucleares infiltrantes en un melanoma contienen una mayoría de linfocitos T. Estas infiltraciones linfocitarias han sido consideradas siempre como expresión de una respuesta inmunitaria antitumoral del hospedador, y ha sido posible

aislar los linfocitos infiltrantes del tumor (TIL) por tratamiento enzimático de la masa tumoral seguido de una purificación en gradiente de densidad.

Los estudios han mostrado que en ciertos casos el 90% de los TIL son linfocitos T (Itoh y col. 1986; Rabinowich y col. 1987). Extraídos inicialmente, los TIL presentan poca o ninguna actividad citolítica sobre el tumor autólogo, apareciendo ésta después de varios días de cultivo de los TIL en MLTC con células tumorales autólogas y en presencia de fuertes dosis de IL-2.

Varios trabajos han demostrado que esta actividad citolítica no está únicamente dirigida contra las células tumorales autólogas, sino también contra tumores alogénicos y contra las células K562 (Miescher y col. 1987; Rabinowich y col. 1987; Heo y col. 1987; Beldegrun y col. 1988).

Esta actividad citolítica del tipo LAK únicamente se ejercía sobre las células tumorales, ya que las células normales autólogas eran insensibles. De igual forma, a partir de melanomas y de un tumor de mama, se ha podido obtener poblaciones TIL que lisan específicamente células tumorales autólogas (Itoh y col. 1986; Topolian y col. 1989; Sato y col. 1986).

NATURALEZA DE LOS ANTIGENOS RECONOCIDOS POR LINFOCITOS T CITOTOXICOS SOBRE TUMORES.

1. ¿Cómo son reconocidos estos antígenos?

Los linfocitos T citotóxicos son incapaces de reconocer al antígeno aislado, sino que necesitan que éste sea procesado y presentado en la superficie celular en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). Además se necesita la identidad del CMH por parte de ambas células, en un fenómeno conocido como restricción de las células T por el CMH (Zinkernagel y Doherty 1974 y 1979)

La estructura del CMH, así como las proteínas que codifica, han sido ampliamente estudiadas en el ratón (complejo H-2) y en el hombre (complejo HLA). Este complejo está constituido por una serie de genes que codifican productos especializados en el procesamiento y presentación de antígeno endógenos y exógenos al sistema inmune (Germain y Margulies 1993). El complejo ha sido dividido clásicamente en dos grupos de genes, unos que codifican para las moléculas de clase I y otros que lo hacen para las moléculas de clase II.

Las moléculas de clase-I son complejos formados por una cadena pesada polimórfica y una cadena ligera o β 2-microglobulina (no codificada por el CMH) y tienen como función principal presentar un antígeno peptídico a los linfocitos T citotóxicos (CD8) (Barber y Parham 1993). Estas moléculas se expresan prácticamente en todas las células somáticas, aunque el nivel de expresión es tejido específico, encontrándose los mayores niveles en tejido linfoide (Harris y Gill 1986).

Las moléculas de clase-II resultan de la asociación de dos cadenas, α y β , siendo la cadena β más polimórfica. Estas moléculas presentan el antígeno a otra subpoblación de linfocitos T denominados cooperadores (CD4), y tiene una distribución tisular mucho mas restringida (principalmente linfocitos B, monocitos, macrófagos y ciertas células epiteliales).

En el hombre la cadena pesada de la molécula de clase-I está codificadas por tres genes: HLA-A, B y C, existiendo un elevado número de alelos, lo que muestra que estos genes tienen un grado muy alto de polimorfismo. El polimorfismo provee una enorme diversidad de péptidos antigénicos que pueden potencialmente ser presentados, confiriendo a una especie dada la posibilidad de generar una respuesta inmune a un antígeno particular, aunque un miembro individual pueda no tener la combinación de alelos requerida (Parham y col. 1989).

El antígeno debe de ser presentado en forma de un pequeño péptido (aproximadamente 9 aminoácidos), que se ensambla en el retículo endoplasmático junto a la cadena pesada y a la β 2-microglobulina para formar la molécula de clase-I. Existen dos estructuras que están implicadas en el procesamiento y en el transporte de péptidos al retículo endoplasmático, y que además están codificadas por el CMH, éstas son: las proteínas LMP-2 y LMP-7 del proteosoma y las proteínas transportadoras TAP.

El proteosoma es un gran complejo proteolítico citoplasmático de estructura cilíndrica multimérica, que es el responsable de la generación de múltiples péptidos a partir de una proteína (Driscoll y col. 1993).

Los transportadores, denominados genéricamente TAP, consiguen que los péptidos generados por el proteosoma sean transportados al lumen del retículo endoplasmático. Existen dos isoformas de estos transportadores: TAP-1 y TAP-2; estas moléculas son polimórficas, aunque la magnitud de este polimorfismo varía dependiendo de la especie, en humanos TAP-1 Y TAP-2 son poco polimórficos (Colonna y col. 1992; Momburg y col. 1994).

No todos los péptidos que derivan de la degradación parcial de la proteína sintetizada en el citosol son presentados por las moléculas de clase-I, se necesita en primer lugar que tengan unas características y un tamaño adecuado (entre 6 y 15 residuos aminoacídicos) para ser transportados y en segundo lugar, deben de tener un motivo específico de unión (agreto) a la molécula de clase-I.

2. Formas de aparición de nuevos antígenos sobre las células tumorales.

De los análisis realizados sobre los genes que codifican los antígenos tumorales de ratón, se ha concluido que son dos los eventos que pueden determinar la aparición de un antígeno de rechazo en la célula tumoral: 1) la mutación de un gen expresado o 2) la activación anormal de un gen.

Mutación de un gen.

Los genes que codificaban para tres antígenos tum- fueron aislados y secuenciados (De Plaen y col. 1988; Lurquin y col. 1989; Szikora y col. 1990; Sibille y col. 1990). Estos genes no recordaban a ningún gen conocido y no presentaban ninguna relación entre ellos, ni a nivel de secuencia ni en la localización cromosómica (Dyson y col. 1992). Cuando la línea original, P815, no mutagenizada fue analizada, se observó que estos genes se expresaban pero que en el caso de la línea mutagenizada cada uno presentaba una mutación puntual en la región codificante, lo cual determinaba el cambio de un aminoácido en la proteína.

Las células P815 no mutagenizadas fueron incubadas con péptidos sintéticos que portaban el aminoácido mutado. Experiencias de lisis "in vitro" demostraron que estas células eran reconocidas por los CTLs anti-tum- cuando los péptidos contenían la mutación tum-, pero no cuando los péptidos pertenecían a la versión no mutada.

Por tanto, las mutaciones puntuales eran las responsables de la aparición de los antígenos tum-.

Otras experiencias realizadas indicaban que la mutación puntual podía implicar la aparición de un nuevo agretopo, que le permitiese unirse a una molécula de clase I del MHC, generando de esta forma un epítipo capaz de ser reconocido por CTLs. Es por tanto posible que mutaciones en un gen puedan generar péptidos antigénicos.

Activación anormal de un gen.

Se ha demostrado la existencia de antígenos de rechazo tumoral (ART) débiles sobre las células del mastocitoma P815 no mutagenizadas. Cuatro de estos ART fueron identificados: P815A, P815B, P815C y P815D (Uytenhove y col. 1983). Los antígenos P815A y P815B estaban codificados por el gen P1A que se encontraba de forma inalterada en la línea tumoral P815 y en las células normales. Por lo tanto estos antígenos no resultaban de una mutación puntual en un gen que se expresa normalmente, sino que el antígeno era producto de un gen inalterado. En este sentido el gen P1A se expresaba fuertemente en varias líneas de mastocitoma, mientras que no lo hacía en tejidos normales, entre ellos las células mastocitarias normales. Se identificó el péptido que era reconocido por los clones de CTLs como un nonapéptido que contenía los dos epítipos A y B (Lethé y col. 1992). Estos

antígenos tumorales derivaban de la activación anormal de un gen silencioso.

EL ANTIGENO TUMORAL MAGE-1.

Mage-1 ha sido el primer antígeno tumoral humano descrito y estudiado en profundidad, pertenece al grupo de antígenos resultantes de la activación anormal de un gen y su expresión en tejidos normales se encuentra restringida al tejido testicular. Aunque fue inicialmente descubierto en melanoma, de ahí su nombre "MAGE" (melanoma antigen), este antígeno se expresa también en tumores de otro tipo histológico, y su descubrimiento evidenció la existencia de un grupo de genes estrechamente relacionados que constituyen la gran familia MAGE (Van der Bruggen y col. 1991; De Plaen y col. 1994). Actualmente otras familias de genes que codifican antígenos tumorales, entre ellas la familia BAGE, están siendo estudiadas (Cox y col. 1994).

EL GEN MAGE-1.

1. Descubrimiento y estructura.

La clonación y descubrimiento del gen Mage-1 fueron posibles gracias a una serie de técnicas que ya se habían utilizado en el estudio de los antígenos murinos tum- (De Plaen y col. 1988). En este método, una genoteca de cósmidos, contruidos con el ADN de la célula que expresa el antígeno buscado, es transfectada

en una célula receptora que no expresa este antígeno. Un test de proliferación del clon CTL que reconoce el antígeno, se utiliza para aislar el transfectante que tiene integrado el gen que lo codifica. El cósmido que contiene este gen se aísla encapsidando directamente el ADN de estos transfectantes en partículas del fago λ .

El antígeno Mage-1 fue descubierto y clonado a partir de la línea MZ2-MEL. Con anterioridad ya se habían generado y clonado frente a esta línea un panel de CTLs autólogos que eran capaces de lisarla (Hérin y col. 1987), y se demostró que reconocían un total de 6 antígenos independientes sobre ella (Van den Eynde y col. 1989). El descubrimiento del gen Mage-1 fue el resultado de la identificación del antígeno MZ2-E. Para ello se utilizó ADN de la línea MZ2-MEL, y como célula receptora se utilizó la línea MZ2-MEL2.2 que había sido obtenida como resultado de una inmunoselección utilizando un clon CTL anti-E. Finalmente se logró obtener un transfectante que fue lisado por el clon de CTL anti-E 82/30 (Travesari y col. 1992a).

Del análisis de la secuencia del ADN genómico transfectante, se observó que la secuencia de este gen no mostraba una similitud significativa con ninguna otra secuencia grabada en el banco de datos. El resultado de varias experiencias mostraron que: 1) el gen MAGE-1 se extendía sobre aproximadamente 4,5 kb y estaba formado por tres exones de 65, 73 y 1551 pb respectivamente; 2) Los dos intrones estaban rodeados de sitios aceptores y donadores de "splicing", cuyas secuencias correspondían con las secuencias consenso descritas (Green 1986); 3)

existía una señal de poliadenilación típica (AATAAA) situada a 19 pb del fin de la secuencia transcrita; 4) en el exón 3 se encontraba la fase abierta de lectura completa, ésta comenzaba 203 pb después del punto de inicio de la transcripción en el ATG situado en posición 66 del exón 3 y terminaba en el codón stop TGA, con un tamaño de 930 pb; y 5) existía una región 3' no traducida de 558 pb (Van der Bruggen y col. 1991).

2. Antígenos que codifica.

En los primeros trabajos realizados sobre el gen Mage-1 también se determinó la asociación del antígeno que codificaba con la molécula de clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad. El paciente MZ2, del cual derivó la línea MZ2-MEL, presentaba una tipificación para moléculas de clase I que era: HLA-A1/A29, B37/B44, Cw6/; sucesivas experiencias mostraron que únicamente aquellas células de melanoma que portaban la especificidad HLA-A1 eran lisadas por el clon de CTL 82/30, cuando se transfectaban con el fragmento de 2,4kb del gen Mage-1. Esto restringía la expresión del antígeno MZ2-E a la especificidad HLA-A1 (Van der Bruggen y col. 1991). La caracterización del péptido antigénico se realizó transfectando fragmentos de diferente tamaño que contenían la secuencia codificante del gen. A partir de la secuencia (300pb del 3^{er} exón) que era capaz de transferir eficientemente la expresión del antígeno MZ2-E, se construyeron péptidos sintéticos,

observándose que la lisis eficiente de células E(-) se obtenía cuando eran incubadas con el nonapéptido EADPTGHSY, codificado por los codones 161 a 169 (Travesari y col. 1992b).

Actualmente se sabe que el gen Mage-1 codifica para otro antígeno denominado MZ2-Bb, determinado por el péptido SAYGEPRKL y unido a la molécula HLA-Cw1601 (Van Der Bruggen y col. 1994).

3. Expresión del gen Mage-1 en tejidos tumorales.

El estudio realizado en un gran número de biopsias tumorales, ha mostrado que existen diversos tipos de tumores que presentan una frecuencia elevada ($> 25\%$) en cuanto a la expresión de Mage-1: Melanomas (38% son positivos para la expresión de Mage-1), Cáncer bronco-pulmonar no microcelular (35% de positividad) y los carcinomas de la esfera O.R.L. (29% de positividad). Otros tumores presentaban una frecuencia menor de expresión: Carcinomas mamarios (17% de positividad) (Brasseur y col. 1992) y carcinomas de próstata (16% de positividad). En estos estudios además se pudo observar que al igual que los melanomas, otros tumores de origen neuroectodermal expresaban también el antígeno Mage-1, tal era el caso de los neuroblastomas y gliomas, aunque los niveles de expresión fueron variables (Rimoldi y col. 1993).

La expresión para Mage-1 fue siempre negativa en el caso de leucemias (Chambost y col. 1993), carcinomas colorectales y carcinomas renales, teniendo en cuenta que el número de muestras analizado fue alto; sin embargo cuando se analizaron líneas de idéntico origen, sí fue común para algunas de ellas la expresión del antígeno Mage-1.

Se sabe que con respecto a los tumores las líneas expresan más frecuentemente el gen Mage-1, aunque se desconoce si este dato está relacionado directamente con el establecimiento permanente de la línea tumoral, o si se trata de un artefacto al medir la expresión antigénica mediante PCR, ya que la pureza de la línea contrasta con la heterogeneidad de la muestra del tumor, que puede poseer un mayor cantidad o prácticamente la totalidad de tejido no tumoral. Curiosamente existe también una diferencia, en cuanto a expresión del gen Mage-1, cuando se analiza la masa tumoral inicial y las metástasis, siendo la expresión del gen más frecuente en estas últimas (De Plaen y col. 1994).

MAGE-1 PERTENECE A UNA FAMILIA DE GENES ESTRECHAMENTE RELACIONADOS (MAGE).

El descubrimiento del gen Mage-1 por T. Boon y su equipo, desembocó de forma inmediata en el descubrimiento de los primeros miembros de lo que hoy es la gran familia MAGE.

Dos especies de ADNc se encontraron cuando se chequeó una librería procedente de la línea MZ2-MEL, utilizando para ello una sonda de 2.4kb que cubría el gen Mage-1. Esto confirmaba la existencia de una familia de genes sugerida por el patrón de bandas observado sobre el Southern blot, ya que adicionalmente a la banda correspondiente a Mage-1 aparecían otras bandas de menor intensidad.

Los nuevos genes fueron denominados Mage-2 y Mage-3, y el análisis del tercer exón mostró que éstos dos estaban más relacionados entre ellos que con el gen Mage-1, aunque presentaban más del 70% de identidad con este último. Al igual que Mage-1 estos dos nuevos genes se expresaban únicamente en células tumorales y tejido testicular (Van der Bruggen y col. 1991).

La confirmación de la existencia de dos nuevos genes Mage-relacionados, desencadenó la búsqueda de nuevos genes que ampliaran la familia. Para ello se construyó una librería de cósmidos a partir de ADN de linfocitos y de la línea MZ2-MEL, estas librerías fueron sondadas con el fragmento BamH I de 2.4kb que

contenían los exones 2 y 3 del gen Mage-1. Los resultados sugerían que la familia MAGE estaba comprendida al menos por 12 miembros que no presentaban un grado de polimorfismo elevado entre los diferentes individuos.

1. Características de los diferentes miembros de la familia MAGE (De Plaen y col. 1994).

El porcentaje de identidad del último exón del gen Mage-1 con los otros miembros de la familia varía entre el 64 y 85%, si bien existe una relación más estrecha entre diferentes miembros de la familia.

1.1 Los genes Mage-2 y Mage-12 (De Smet y col. 1994).

Entre el gen Mage-2 y Mage-12 existe una identidad del 90%. La relación entre Mage-2 y Mage-1 es del 77%, y en relación con la estructura exónica, Mage-2 presenta un exón más. Sin embargo la fase abierta de lectura se encuentra al igual que en Mage-1 en el exón 3, y el codón de iniciación de la lectura corresponde igualmente al utilizado por Mage-1. Finalmente la fase abierta de lectura del gen Mage-2 cubre 945 pb. Respecto a Mage-12 presenta un 76% de identidad con Mage-1, y actualmente se desconoce su organización exón-intrón.

1.2 Los genes Mage-3 y Mage-6.

Entre ambos genes existe una identidad del 99%. Mage-3 presenta una identidad del 73% con Mage-1, y al igual que éste la fase abierta de lectura se encuentra íntegramente en el último exón. De la misma forma que Mage-1 y Mage-2 el codón ATG en posición 66 del exón 3 inicia la fase abierta de lectura que se extiende 945 pb. El gen Mage-6 además de presentar una gran identidad con Mage-3, presentan la misma organización exón-intrón, además de que los sitios de "splicing" están perfectamente conservados.

Especial mención merece el gen Mage-3, ya que al igual que Mage-1 codifica para un antígeno que es reconocido por CTLs autólogos. El antígeno MZ2-D es presentado al igual que el antígeno MZ2-E por la línea MZ2-MEL y curiosamente también se encuentra restringido por la especificidad HLA-A1. Aunque ambos péptidos se unen a la misma molécula, sin embargo son reconocidos por CTLs diferentes; esto permitió averiguar, mediante experimentos de competición, que residuos de los dos péptidos homólogos estaban involucrados en la unión a la molécula HLA-A1. De los experimentos se concluyó que los residuos involucrados eran: un residuo de Aspártico (D) en posición 3 y un residuo de Tirosina (Y) en posición 9 (Gaugler y col. 1994).

1.3 Los genes Mage-4 y Mage-5.

Como se ha dicho anteriormente la familia MAGE constituye un grupo de genes muy poco polimórficos, siendo estos dos genes los únicos que presentan alelos conocidos. Estos dos alelos descubiertos son denominados como a y b, y la identidad entre ellos es de más del 99%. Los análisis realizados en el ADNc del alelo Mage-4a muestran que éste se puede presentar de diferentes formas, presentando diferentes primeros exones homólogos al exón 1 de Mage-1, pero con los mismos exones 2 y 3; éstos primeros exones presumiblemente serían consecuencia de inicios de transcripción y "splicing" alternativos. En cuanto a Mage-5, ambos alelos presentan una estructura exón-intrón similar a la de Mage-1. La fase abierta de lectura se encuentra en el tercer exón y comienza con el codón de iniciación equivalente utilizado en los otros genes MAGE, terminando 372pb más abajo.

1.4 Los genes Mage-7, Mage-8, Mage-9, Mage-10 y Mage-11.

Ninguno de estos genes contienen secuencias homólogas a la parte 5' del gen Mage-1. Cada uno de los genes Mage-7, -8, -10 y -11 poseen en 5' una secuencia de 100 a 500 pb que le es característica y que no está emparentada con la secuencia de Mage-1. Esta secuencia está seguida de una parte homóloga a Mage-1, y curiosamente comienza a la misma altura en cada uno de estos genes. Este grupo de

genes conservan los sitios de "splicing" utilizados por los exones 2 y 3 del gen Mage-1. Fue posible obtener el ADNc, a partir de varias muestras de ARN, de los genes Mage-8, -9, -10 y -11, sin embargo para el gen Mage-7 jamás se pudo obtener el ADNc correspondiente. El mismo codón que abre la fase de lectura en Mage-1 lo hace en los genes Mage-8 (705 pb), Mage-9 (948 pb), Mage-10 (1110 pb) y Mage-11 (960 pb). La fase de lectura de Mage-7 comienza a 307 pb más arriba del codón de iniciación de Mage-1 y termina 279 pb más allá.

2. Localización cromosómica de la familia MAGE (De Plaen y col. 1994).

Las primeras evidencias en el estudio la familia MAGE indicaban que la mayoría de los genes estaban estrechamente ligados, de hecho, se encontraron diversos cósmidos que transportaban dos e incluso tres genes Mage. Esto fue observado para Mage-10 y Mage-5a/b; Mage-2, Mage-12 y Mage-6; Mage-2, Mage-12 y Mage-3 y Mage-7 y Mage-9. parecía, por tanto, que ciertos genes MAGE estaban ordenados en tándem.

La localización cromosómica de los genes Mage se determinó mediante el análisis de Southern blot de una serie de líneas híbridas somáticas hámster x hombre. La distribución de líneas híbridas que presentaban una señal positiva para la sonda Mage-1 correspondían con la distribución de líneas que contenían el cromosoma X humano. La prueba definitiva la aportó el análisis de las líneas híbridas GM7301

(que contenía los cromosomas humanos 12 y X) y GM10868 (que contenía el cromosoma humano 12). Experiencias de PCR que amplificaban específicamente cada uno de los genes Mage mostraron que todos ellos se identificaban en el ADN del híbrido GM7301, pero no en el híbrido GM10868. Estos resultados indicaban por tanto que la totalidad de los genes MAGE se encontraban en el cromosoma X. Otras experiencias posteriores localizaron más concretamente a la familia MAGE en el brazo largo del cromosoma X, en la región q26-qter.

Estas experiencias verificaron también la existencia de los alelos a y b en los genes Mage-4 y Mage-5, ya que en el híbrido GM7301 se encontraban sólo los alelos Mage-4b y Mage-5b. Por el contrario, Mage-3 y Mage-6, que presentaban un 99% de identidad, ambos fueron encontrados en el híbrido GM7301, lo cual indicaba que pertenecían a diferentes loci.

3. Expresión tumoral de los diferentes miembros de la familia MAGE (De Plaen y col. 1994).

De todos los miembros de la familia, sólo seis miembros mostraron una alta expresión cuando se analiza en numero elevado de tumores de diferentes tipos histológicos. Estos fueron los genes: Mage-1, Mage-2, Mage-3, Mage-4, Mage-6 y Mage-12. No se encontró transcrito de Mage-7 en ninguno de los tumores analizados y de igual forma esta carencia se observó también en tejido testicular, el cual

expresaba todos los miembros de la familia MAGE. Actualmente se acepta que Mage-7 es un pseudogen.

En comparación con Mage-1, los genes Mage-2, Mage-3 y Mage-6 generalmente presentan un porcentaje de expresión mayor, sobre todo en melanoma. El caso de Mage-4a/b es diferente, ya que su expresión máxima no la alcanzaba en melanomas sino en cáncer de origen bronco-pulmonar y de laringe. El análisis de tejidos normales reveló que al igual que el testículo, la placenta expresaba los genes Mage-3, Mage-4 y Mage-8-11.

No parece que exista una correlación estricta entre la expresión de los diferentes genes, sin embargo, en melanomas nunca se han encontrado muestras que expresen el gen Mage-1 o Mage-4 sin expresar los genes Mage-2 y Mage-3.

LA PROTEINA MAGE-1

1. Características de la proteína.

La fase abierta de lectura del gen Mage-1 codifica una proteína de 309 aminoácidos, que corresponde a un peso molecular de 34,3 kd. Estudios más exhaustivos han puesto de manifiesto la existencia de sitios potenciales de modificación covalente de la proteína: un sitio potencial de N-glicosilación, seis sitios potenciales de fosforilación por la casein kinasa, cuatro sitios para la proteína C kinasa y uno para la tirosín kinasa. El análisis del extremo N-terminal de la proteína MAGE-1 reveló que no poseía la secuencia señal característica que dirige a la proteína nascente hacia el retículo endoplasmático. Esta secuencia está caracterizada por la abundancia de aminoácidos hidrófobos (Von Heijne. 1982). Sin embargo se localizó un posible dominio transmembrana alrededor del residuo 200 (De Plaen y col. 1994).

La introducción de la secuencia de la proteína MAGE-1 en un banco de datos, determinó que existía una débil homología con la proteína codificada por el gen de la neudina de ratón. El ADNc de este gen se aisló a partir de una genoteca de células de carcinoma embrionario de ratón tratadas con ácido retinoico. Se ha propuesto que el gen de la neudina participa en la diferenciación de las células neurales (Maruyama y col. 1991). Estas proteínas presentan únicamente un 20% de

identidad de secuencia, pero existen ciertas regiones que están muy bien conservadas, como son los residuos hidrofóbicos y la estructura típica del dominio transmembrana.

Respecto a las otras proteínas, codificadas por los demás miembros de la familia MAGE, cabe destacar que: todas comienzan por el aminoácido Metionina, codificado por el mismo codón ATG equivalente; los codones STOP son diferentes y determinan longitudes de fase de lectura abierta variables. Por tanto, las proteínas codificadas por los genes MAGE son de tamaño diferente, pero presentan una gran similitud de secuencia; sin embargo la secuencia del péptido MZ2-E codificado por Mage-1 no está conservada en ninguna de estas proteínas, lo que determina que solamente el gen Mage-1 sea capaz de producir este antígeno.

2. Localización celular de la proteína.

La información que actualmente se tiene sobre la proteína nativa MAGE-1 deriva de estudios realizados con anticuerpos monoclonales o antisueros obtenidos bien frente a la proteína recombinante, o frente a péptidos sintéticos específicos de MAGE-1.

El grupo de Yao-Tseng Chen obtuvo una serie de anticuerpos monoclonales frente a una proteína recombinante truncada y varios antisueros frente a distintos péptidos sintéticos, así como frente a la misma proteína recombinante. Todos los anticuerpos monoclonales, al igual que los antisueros fueron capaces de reconocer la proteína recombinante, sin embargo sólo un anticuerpo monoclonal y los antisueros de conejo fueron capaces de reconocer el producto de la proteína MAGE-1 en lisados celulares.

El peso molecular de la proteína reconocida era de 46 kd, lo que contrastaba con los 34,3 Kd teóricos. Una posible explicación dada para esta discrepancia era que la proteína MAGE-1 emigraba de una forma anómala en una electroforesis SDS/gel de poliacrilamida, o bien que debido a modificaciones postraduccionales, teóricamente posibles, la proteína aumentase de masa (Chen y col. 1994).

Los anticuerpos monoclonales y antisueros obtenidos hasta ahora eran incapaces de reconocer a la proteína MAGE-1 en preparaciones histológicas. La obtención de nuevos monoclonales y nuevos análisis han puesto de manifiesto que

la proteína MAGE-1 presenta una localización citoplasmática paranuclear en las células de la línea MZ2-MEL, esto está en consonancia con la noción de que la mayoría de los autopéptidos presentados en el contexto del CMH clase I derivan de proteínas abundantemente representadas en el citosol celular (Schultz y col. 1994; Amar-Costesec y col. 1994).

Sin embargo se desconoce aún que células del tejido testicular expresan en condiciones fisiológicas la proteína, y en este sentido se desconoce también cual sería su localización citológica en las mismas condiciones. Ultimamente, se ha descubierto una de las posibles condiciones fisiológicas de la expresión del gen Mage-1; este gen se expresaría transitoriamente durante la cicatrización de heridas cutáneas (Becker y col. 1994).

REGULACION TRANSCRIPCIONAL DEL GEN MAGE-1.

1. Mecanismos transcripcionales y regulación transcripcional.

La transcripción y su regulación, implica esencialmente interacciones entre proteínas específicas que se unen al ADN en secuencias generalmente anteriores al punto de iniciación de la transcripción. Los genes que codifican para proteínas, únicamente son transcritos por la ARN polimerasa II.

La región promotora de un gen designa la parte que contiene las secuencias implicadas en la iniciación y regulación de su transcripción. Entre las secuencias que participan en la transcripción de un gen, la secuencia TATA box, caracterizada por la secuencia consenso 5'-TATA A/T A/T-3' (Brecatnach y Chambon 1981), juega un papel clave. Esta secuencia permite que la maquinaria transcripcional ocupe su sitio, también determina el sitio de iniciación de la transcripción, 25 a 30 nucleotidos mas allá del sitio de unión y parece que igualmente define el sentido de la transcripción. Sin embargo no todos los genes poseen una secuencia TATA box, en este caso esta secuencia es reemplazada por otro elemento denominado INICIADOR (Smale y Baltimore 1989). Estos elementos iniciadores que se extiende hacia ambas partes del sitio de iniciación de la transcripción, se agrupan en familias atendiendo a sus secuencias. Cuando además la región promotora contiene una secuencia TATA box, el elemento iniciador sirve para aumentar la transcripción basal (Weis y

Reinberg 1992).

Las otras secuencias nucleotídicas del promotor sirven para la regulación de la transcripción. Estos elementos moduladores llamados UPE (Upstream Promoter Elements), están generalmente situados hasta 300 pb antes del sitio de iniciación. Se han descrito algunos elementos moduladores situados mas allá de este sitio. Las secuencias nucleotídicas de estos elementos determinan la unión de proteínas específicas llamadas factores de transcripción (Maniatics y col. 1987). Igualmente, existen secuencias localizadas a mayores distancias, antes y después del sitio de inicio de la transcripción, que pueden igualmente modular la actividad transcripcional. Estas secuencias son las llamadas POTENCIADORES o SILENCIADORES, según que activen o repriman la transcripción respectivamente. Estas estructuras se agrupan en sitios de unión para diferentes factores de transcripción. Una característica de estos potenciadores y silenciadores es que funcionan de forma independiente a su orientación con respecto al sitio de iniciación de la transcripción (Muller y col. 1988).

1.1 *La maquinaria transcripcional* (Weis y Reinberg 1992).

La ARN polimerasa II es incapaz por sí sola de transcribir un gen, para ésto necesita diferentes factores, algunos de los cuales participan en la formación del complejo de preiniciación de la transcripción (TFIIA, TFIIB, TFIID y TFIIE). Otras

fracciones están implicadas en la elongación del ARN naciente (TFIIS, TFIIF). El primer factor que interviene, una vez que se ha ensamblado el complejo de preinicialización, es el TFIID que actúa como un centro de nucleación sobre el cual se asocian secuencialmente otros factores.

Cuando el factor contiene únicamente una secuencia INICIADORA, la primera etapa parece ser la unión de una proteína específica sobre esta secuencia.

1.2 Modulación de la actividad transcripcional basal.

Los factores de transcripción interaccionan con elementos moduladores de la región promotora asegurando la regulación positiva o negativa de la actividad de la maquinaria transcripcional. La mayoría de estos factores presentan una estructura multifuncional, teniendo entre otros un dominio de unión al ADN y un dominio modulador de la transcripción. Algunos factores únicamente poseen uno de estos dos dominios, y están por consiguiente obligados a asociarse a un factor complementario antes de poder influir en la actividad transcripcional. Los dominios moduladores de los factores de transcripción actúan sobre diferentes componentes de la maquinaria transcripcional. Varios factores interactúan directamente con la fracción TFIID (Ptashne y Gann 1990). Estos factores interactúan con la subunidad de unión a la secuencia TATA-box (TBP) o con otras proteínas de la fracción TFIID llamadas coactivadores.

La fracción TFIIB ha sido igualmente identificada como diana de ciertos factores de transcripción. La interacción parece directa y tendría como efecto facilitar la unión de TFIIB sobre TFIID, ya fijada al ADN. Esta reacción es precisamente considerada limitante cuando tiene lugar la unión del complejo de preinicialización in vivo (Sharp 1991).

La parte carboxi-terminal de la subunidad grande de la ARN pol II parece igualmente poder mediar el efecto de los factores de transcripción (Liao y col. 1991). Se ignora si esta región de la ARN pol II está implicada en interacciones directas con factores transcripcionales.

1.3 Activación de los factores de transcripción (Latchman 1991).

La activación específica de un gen en un tipo particular de célula o en respuesta a estímulos está mediada por factores de transcripción que se unen a sus secuencias diana, estos factores necesitan un sistema de regulación de su actividad. Dos mecanismos aseguran esta regulación: 1) Los factores no se expresan más que en la célula cuyo efecto modulador es requerido. 2) Los factores están presentes bajo una forma inactiva y sufren una etapa de activación cuando deben modular la transcripción de sus genes diana.

El control de la expresión se aplica a la mayoría de los factores de transcripción implicados en la regulación de los genes específicos de un tipo celular.

La regulación de la síntesis de estos factores interviene a nivel de la transcripción, del splicing o de la traducción.

La activación de formas preexistentes, pero inactivas, se aplica generalmente a factores que responden a estímulos exteriores. Tres mecanismos están implicados en esta forma de activación. En un primer caso, el estímulo se presenta bajo la forma de una molécula que se une al factor y lo activa. En otra situación, el factor es mantenido bajo una forma inactiva por su asociación con una proteína inhibidora, el estímulo exterior tendría por efecto disociar este complejo, y el factor así liberado puede entonces influenciar en la transcripción de sus genes diana. Y por último, la actividad de numerosos factores de transcripción está alterada por modificaciones postraduccionales, tales como la fosforilación o la glucosilación. Agentes exteriores podrían actuar sobre las enzimas responsables de estas modificaciones. La activación de la proteína quinasa C y A, por ejemplo, están implicadas en la modulación de la actividad de un gran número de factores.

1.4 Interacciones entre los factores de transcripción.

Numerosos factores de transcripción actúan de forma cooperativa. En una situación de cooperación, la activación conjunta de factores es superior a la suma de sus activaciones independientes. Este sinergismo pasa por contactos simultáneos de diferentes factores de transcripción con uno, o varios, de la maquinaria

transcripcional (Carey y col. 1990).

En ciertas formas de represión de la transcripción, la unión del factor activador sobre la secuencia diana es inhibida por otro factor no activador que ocupa la misma secuencia. Esta competición de unión al ADN implica a veces dos factores activadores, y no se comprende como en esta situación, el factor competidor pierde su propiedad inductora. La inhibición de la unión al ADN no es la única forma de interacción represiva entre los factores de transcripción. Ciertos factores represores, son, en efecto, capaces de bloquear la función activadora de otros factores unidos al ADN. Esta represión se hace por interacción directa con el dominio activador, o por mediación de un mediador indispensable en la transmisión de la señal positiva por el factor activador (Renkawitz 1990).

1.5 *La metilación del ADN en el control de la transcripción* (Bird 1992).

El ADN de vertebrados presenta frecuentemente la metilación de las citosinas situadas en posición 5' de una guanina. Esta modificación no existe en otras clases de eucariotas (ej: drosófila o levaduras). La metilación de la región promotora de los genes está generalmente asociada a su inactividad transcripcional, aunque no se sabe todavía si este fenómeno corresponde a un mecanismo activo de regulación, o si es consecuencia pasiva de la inactivación de los genes.

La metilación aparece sin embargo como un mecanismo indispensable al

desarrollo y a la supervivencia de los vertebrados. En efecto, Li y col. 1992, obtuvieron embriones de ratón en los que los dos alelos del gen de la metiltransferasa fueron inactivados, comprobándose que estos embriones se desarrollaban anormalmente y morían antes del fin de la gestación. Por otra parte, se sabe que el ADN sufre mutaciones más frecuentes cuando está metilado. Esto se traduce por el hecho de que, entre las mutaciones puntuales responsables de enfermedades genéticas en el hombre, más de un tercio implica el cambio de un par CG por otro TG, y ésto teniendo en cuenta que el dinucleotido CG es el más raro. Es poco probable que la adquisición de un sistema de metilación en los vertebrados sea un paso en falso de la evolución, debe de existir por tanto una ventaja compensatoria de esta peligrosa fragilización del ADN.

Aunque el papel exacto de la metilación no se conoce, parece que ésta tiene tendencia a adaptarse al estado transcripcional de los genes. Niwa y col. 1983, mostraron que el virus de la leucemia del ratón Moloney únicamente se transcribía, en células de carcinoma embrionario, cuando se introducía bajo la forma no metilada. También mostraron, que varios días después, el ADN introducido adquiría el patrón metilado característico. Por otra parte, existen ejemplos que muestran que la activación transcripcional de un gen precede a su desmetilación (Wilks y col. 1985). Se ha propuesto que la represión que acompañan a la metilación de un gen tendría por función asegurar la inactividad completa de este gen, ya que sin esta modificación del ADN podría persistir un nivel basal de transcripción.

La unión al ADN de ciertos factores de transcripción es inhibida por la presencia de un CpG metilado en su sitio de reconocimiento. Muchos otros factores, por contra, son insensibles a la metilación de sus secuencias de unión, o tienen una secuencia de unión desprovista de CpG. La metilación no parece por tanto una forma general de inhibición directa de la unión de factores de transcripción al ADN. Recientes descubrimientos han permitido comprender mejor como la metilación de los pares CpG puede influenciar la actividad de un gen. Recientemente se han aislado en ratón dos proteínas que se unen específicamente a secuencias de ADN que están metiladas (Meehan y col. 1989; Lewis y col. 1992). Para una de ellas, MeCP1 (metil-CG-binding protein), es necesario al menos 12 pares de CpG simétricos para la unión; para la otra, MeCP2, es suficiente un par simétrico. Los estudios hechos sobre MeCP1 muestran que esta proteína tiene una influencia negativa sobre los niveles transcripcionales del gen, cerca del cual se une.

2. La región promotora del gen MAGE-1 (De Smet y col. 1995).

A pesar de la gran identidad existente entre todos los genes de la familia MAGE, el extremo 5' de ellos, zona promotora, es bastante variable. Se ha sugerido que las sucesivas duplicaciones del gen MAGE, durante la evolución, ha conseguido genes con una misma función bajo diferentes controles de transcripción; ésto ha podido desembocar en una expresión de los diferentes genes temporal y regional

muy específica (De Plaen y col. 1994).

El promotor del gen Mage-1 carece de la secuencia TATA-box, sin embargo, la secuencia que rodea al sitio de iniciación de la transcripción de este gen, recuerda a la secuencia INICIADORA del gen de la deoxinucleotidiltransferasa termina (TdT) (Smale y Baltimore 1989).

Se analizó la región promotora del gen Mage-1, entre los nucleótidos -792 - +118, encontrándose un gran número de secuencias consenso de unión para factores de transcripción. Entre estos existía sitios potenciales de unión para factores AP-2, que son factores de transcripción semiubícuos. La síntesis de este factor es estimulada por el ácido retinoico, y su actividad está modulada por las proteínas kinasa A y C.

Para el estudio de la secuencia promotora, desde distintos puntos de vista, se utilizó la línea MZ2-MEL que expresaba fuertemente el antígeno Mage-1. El resultado fue la identificación de cinco regiones activadoras:

1. La Región C (MZ2), situada entre -792 y -714, y cuya ausencia disminuía la actividad del promotor en un 25 %, contenía dos secuencias consenso para unión de factores de transcripción, una para el factor represor GCF y otra, en antisentido, para el factor activador H4TF1, que se une específicamente al gen de la histona H4 (Dailey y col. 1988).
2. La región A, situada entre -146 y -91, era responsable del 20 % de la actividad del promotor. Esta región contenía una serie de secuencias repetidas, que

correspondían a sitios potenciales de unión del factor AP-2. Sin embargo diversas experiencias demostraron que la zona reguladora positiva se extendía desde -123 a -99 y que eran factores del tipo Sp1 los implicados.

3. La región B', situada entre -67 y -55, funcionaba únicamente de forma sinérgica con la región A. Esta región contenía una secuencia consenso de unión para factores de la familia Ets, en orientación antisense con respecto al sitio de iniciación de la transcripción.

4. La región B, situada entre -55 y -43, sustentaba alrededor del 50% de la actividad del promotor. Esta parte de la secuencia promotora contenía sitios potenciales de unión para dos familias de factores: La familia Ets y la familia de factores ubicuos ATF.

5. La región D, situada entre +26 y +47, no presentaba ningún sitio de unión para factores conocidos. Sin embargo esta región era capaz de aumentar la actividad de la región B al doble.

(Ver fig. 22 en RESULTADOS)

Experiencias al margen, han puesto de manifiesto la implicación de la metilación en la actividad transcripcional del gen Mage-1 (Weber y col. 1994). Varias líneas tumorales Mage-1 negativas y de origen histológico diferente, se transformaban en positivas cuando se las sometía a un protocolo de desmetilación con el agente 5-aza-2'-deoxicitidina (DAC). Sin embargo esto no ocurría cuando se aplicaba a células normales en cultivo o incluso con otras líneas tumorales, lo que

pone de manifiesto la importancia de los factores transcripcionales que pueden ser los que en último momento determinan la actividad del promotor. Sin embargo aún no se ha demostrado si la desmetilación tiene un efecto cis-regulador, trans-regulador o ambos, y a que regiones concretas del promotor puede afectar.

IMPORTANCIA DE LA PROTEINA MAGE-1.

Aunque se desconoce por el momento la función celular de la proteína Mage-1, su relación funcional con el resto de la familia, así como su localización celular definitiva en aquellas células que la expresan en condiciones fisiológicas; el conocimiento de los antígenos que produce así como de su potencialidad en producir nuevos antígenos aún sin descubrir, hacen que la proteína Mage-1 presente una importancia que va más allá de las puras consideraciones estructurales y funcionales. En efecto, se sabe que otras proteínas son capaces de generar diferentes péptidos que se combinan con varias moléculas de clase-I para formar antígenos reconocidos por diferentes CTLs, tal es el caso de la nucleoproteína del virus de la Influenza (McMichael y col. 1986; Taylor y col. 1987). En el caso de MAGE-1, hasta el momento se han detectado dos antígenos, uno asociado a la molécula HLA-A1 (Van der Bruggen y col. 1991) y otro a la molécula HLA-Cw1601 (Van der Bruggen y col. 1994); de forma similar se han encontrado dos antígenos de la proteína MAGE-3, uno asociado a la molécula HLA-A1 (Gaugler y col. 1994) y otro a la molécula HLA-A2 (Van der Bruggen y col. 1995). Esto puede representar una mínima parte de los antígenos que podrían ser generados, no sólo por la proteína MAGE-1, sino por otros miembros de la familia. De esta forma la posibilidad de que un individuo con un tumor positivo para la expresión de algún miembro de la familia MAGE generara una respuesta inmune frente al tumor sería muy elevada. En este contexto

se observó que pacientes aquejados de melanoma, previamente inmunizados con una vacuna de células de melanoma, generaban anticuerpos que reconocían la proteína recombinante Mage-1; con la particularidad de que estos pacientes no presentaban un haplotipo particular (Hoon y col. 1995).

En los últimos años diversos grupos están ensayando la posibilidad de obtener una vacuna que permita intensificar la respuesta inmune frente a aquellos tumores que expresen el antígeno Mage-1. Se ha propuesto la vacunación con células de melanoma completas o bien con un péptido sintético Mage-1 (Salgaller y col. 1994). En el caso de Mage-1, y teniendo en cuenta el antígeno MZ2-E, la cobertura de inmunización para pacientes de melanoma sería del 10%, ya que la frecuencia del alelo HLA-A1 en la población es del 26% y el 40% de los melanomas expresan Mage-1. Esta cobertura se podría ampliar al 18% teniendo en cuenta al antígeno MZ2-D, ya que el gen Mage-3 se expresa en un 69% de los melanomas. Sin embargo, hay que tener en cuenta la posibilidad de una pérdida antigénica por parte de la célula tumoral, favorecida por el carácter hemicigótico de los genes MAGE (Oaks y col. 1994); en este sentido sería efectiva la inmunización de los pacientes contra ambos antígenos, ya que además se ha observado que siempre que está presente Mage-1 también lo está Mage-3. Por otra parte, no se puede olvidar que los antígenos son presentados en el contexto de las moléculas de histocompatibilidad, y que han sido descritas las pérdidas totales o alélicas de estas moléculas (Garrido et al. 1994); ésto junto con otras alteraciones en la superficie celular, que

implicaran a las moléculas de adhesión, podría suponer un contratiempo al desarrollo de una inmunoterapia antitumoral efectiva.

OBJETIVOS

MAGE-1 ha sido el primer antígeno tumoral humano descrito, y aunque fue inicialmente descubierto en melanoma, hoy se sabe que se expresa en gran número de tumores de diferente origen histológico.

Desde su descubrimiento en 1991, por el equipo del Dr. T. Boon en el Instituto Ludwig para la Investigación del Cáncer de Bruselas, las investigaciones se han orientado especialmente hacia el desarrollo de terapias inmunes efectivas, dirigidas contra aquellos tumores portadores del antígeno. De forma paralela se ha incrementado el número y tipo de tumores que expresan el antígeno, e igualmente se ha continuado la búsqueda de nuevos antígenos tumorales capaces de desencadenar una respuesta inmune autóloga.

Otra aproximación al antígeno MAGE-1, aunque teóricamente desde un punto de vista menos clínico, ha sido el estudio de su expresión a nivel molecular, así como el estudio y características biológicas de la proteína MAGE-1. Siguiendo en esta línea, los objetivos que nos hemos planteado en este trabajo han sido:

- El estudio de la proteína MAGE-1, que se ha concretado en el intento de localizarla en diferentes muestras de tejido tumoral y normal, así como en el análisis de su expresión en la masa tumoral.

- El estudio de las posibles implicaciones de la expresión del gen Mage-1 en la diferenciación celular, así como en el proceso tumorigénico.

- El estudio del promotor del gen Mage-1, concretamente de la región que sustenta la mayor parte de la actividad transcripcional. En este sentido, el objetivo fundamental es determinar el estado de metilación de dicha región, su importancia y su actividad transcripcional comparada en distintas líneas tumorales.

MATERIAL Y METODOS

1.CLONACION DE LA FASE ABIERTA DE LECTURA DEL GEN

MAGE-1.

1.1.OBTENCION DEL INSERTO.

El inserto fue obtenido mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), utilizando unos oligonucleótidos específicos y ADN de linfocitos.

1.1.1.MATERIAL.

- Oligonucleótidos sintetizados con un Sintetizador de ADN sistema 200A (*Beckman Instruments*):

BamH1

MAGEFW 5' AAGGATCC/CTTGAGCAGAGGAGTCTG 3'

EcoR1

EGAMBW 5' CTTGAATTCCTA/TCAGACTCCCTCTTCCTC 3'

- ADN de leucocitos.

1.1.2.REACCION.

- 0,5 μ g de ADN genómico.
- 250 ng de cada oligonucleótico.
- 5 μ l de una mezcla de dNTPs 10 mM.
- 5 μ l 10X PCR buffer (500 mM ClK, 15 mM Cl₂Mg, 100 mM Tris-ClH y 0,1 % gelatina, pH 8,4).

- 1 U de Taq ADN polimerasa (*Boehringer*).
- (50 μ l volumen final de la reacción).

1.1.3.CONDICIONES DE LA PCR.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador *Perkin Elmer Cetus Instruments*:
(94°C 5 minutos) x 1 ciclo,(94°C 1 minuto , 54°C 1 minuto, 72°C 2 minutos)
x 30 ciclos, (72°C 10 minutos) x 1 ciclo.

1.1.4.PURIFICACION DEL AMPLIFICADO.

El amplificado presentaba la particularidad de tener sus extremos polarizados por la existencia de puntos de corte para enzimas de restricción diferentes (BamH1 en el extremo 5' del gen y EcoR1 en el extremo 3'). Con esta purificación se pretendía limpiar el amplificado de todos los reactivos de la PCR que aún quedaban como tales, incluida la enzima Taq polimerasa, y que podían interferir en la posterior digestión enzimática.

1.1.4.1.REACTIVOS.

- Kit CLEAN UP system (*promega*).
- Propanol 80%.

1.1.4.2.METODO.

La purificación consistió en la captación del ADN amplificado por una resina, que excluye de ésta manera al resto de los reactivos del amplificado.

1. Primeramente se incubó el amplificado (20 μ l) con 1 ml de la solución de resina durante 5 minutos a temperatura ambiente.

2. Esta solución fue pasada posteriormente, mediante jeringa, por una minicolumna en la cual la resina, que captó el ADN, queda retenida.

3. Posteriormente la resina fue lavada con propanol 80%, se dejó evaporar y se pasó por la columna 50 μ l de agua bidestilada a 65 °C.

4. La columna fue centrifugada, insertada en un tubo eppendorf, a 15000 rpm en microcentrífuga durante un pulso y finalmente el eppendorf fue recogido con el ADN diluido en el agua y listo para digerir.

1.1.5.DIGESTION ENZIMATICA DEL INSERTO MAGE-1 Y DEL VECTOR DE EXPRESION pGEX-2T.

Ambos, inserto y vector, fueron digeridos con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI.

1.1.5.1.REACCION.

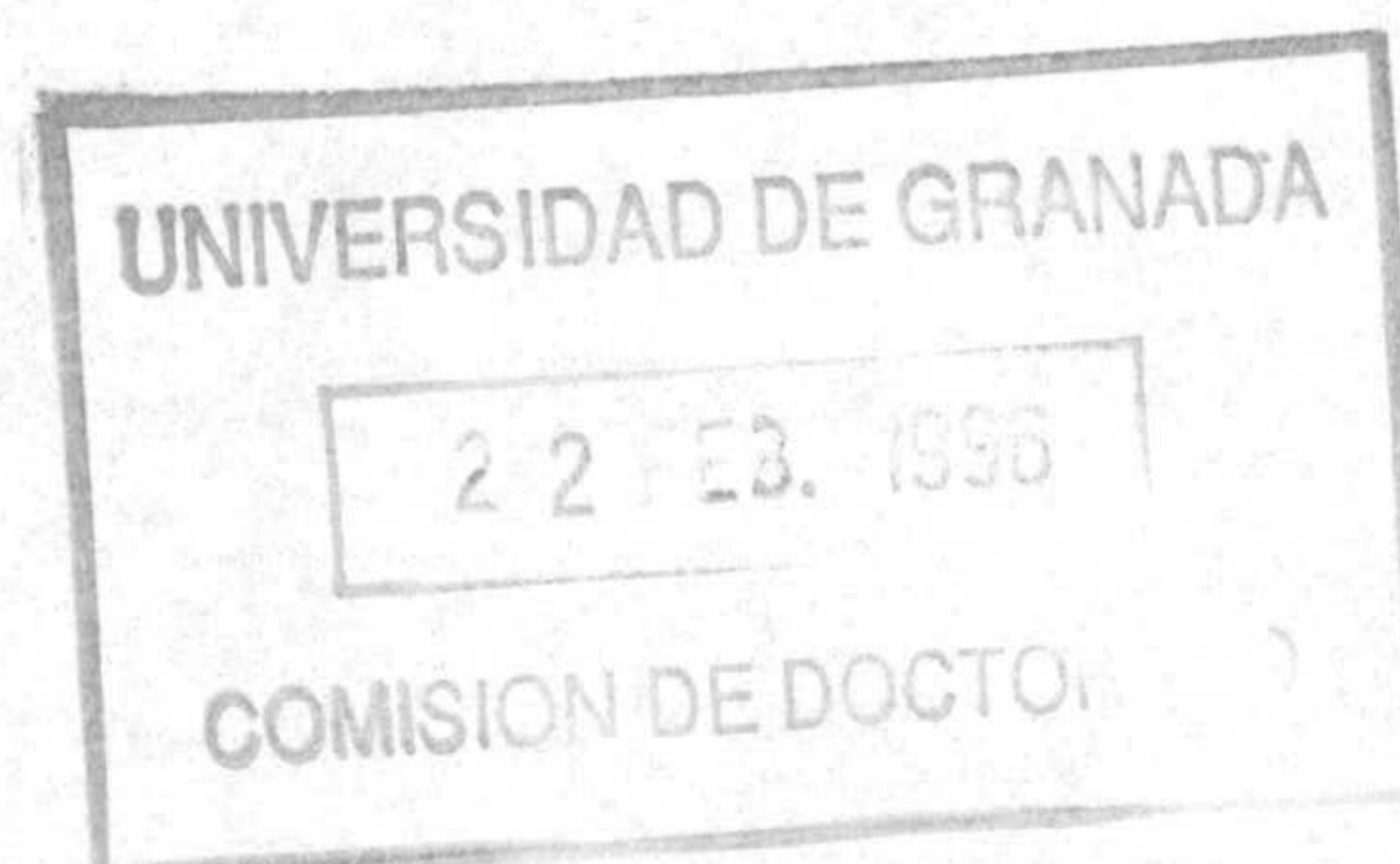
- 1 μ g de inserto MAGE-1 ó de pGEX-2T (*Pharmacia*).
 - 3 μ l de 10X buffer B (50 mM Cl_2Mg , 1M $ClNa$, 10 mM β -mercaptoetanol, 100 mM Tris- ClH pH 8.0) (*Boehringer*).
 - 10 U BamHI (*Boehringer*).
 - 10 U EcoR1 (*Boehringer*).
- (30 μ l de volumen final, 37°C durante 1 hora).

1.1.6.PURIFICACION EN GEL DE AGAROSA DEL INSERTO (MAGE-1) Y DEL VECTOR (pGEX-2T) DIGERIDOS.

1.1.6.1.PREPARACION DEL GEL DE AGAROSA AL 1%.

1.1.6.1.1.MATERIAL.

- Agarosa (*Sigma*).
- Solución TAE x 50 (0.4 M Tris-acetato, 0.01 M EDTA pH 8.0).
- Solución de Bromuro de Etidio.
- Tampón de carga (0.25% azul de bromofenol, 0.25% Xilene Cyanol, 15% Ficoll 400).



1.1.6.1.2.PREPARACION.

Se pesaron 0.5 grs. de agarosa en un pequeño matraz, se le añadió 49 ml de agua bidestilada, se agitó la solución para homogenizar y se calentó hasta ebullición. Posteriormente se dejó enfriar un poco y se le añadió 1 ml de 50 x TAE y de la solución de bromuro de etidio. La solución fue nuevamente agitada y vertida sobre el soporte del gel. Dada la toxicidad de los vapores de bromuro, la preparación se realizó en campana de extracción de gases.

1.1.6.2.ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

Fue llevada a cabo en una cubeta pequeña de electroforesis. A las muestras se le añadió tampón de carga, en este caso se chequearon los 30 μ l de la reacción. Las muestras fueron cargadas en los pocillos horizontales del gel, y éste fue sometido a una diferencia de potencial de 100 V en solución TAE x 1. La electroforesis se chequeó a intervalos de tiempo variable en un transiluminador UV, hasta que la banda del inserto y del plásmido lineal eran perfectamente visibles y diferenciables. En este momento se procedió a la purificación del inserto y del vector.

1.1.6.3.PURIFICACION DEL INSERTO Y DEL VECTOR.

1.1.6.3.1.MATERIAL.

- Kit GENE CLEAN (*Bio 101 Inc.*).

1.1.6.3.2.METODO.

Se siguió el protocolo *Gene Clean*.

1. Con la ayuda del transiluminador ultravioleta se cortó con bisturí la banda correspondiente al inserto y la correspondiente al vector lineal. El trozo fue depositado en un eppendorf, al cual se le añadió 3 volúmenes de NaI.

2. Los tubos fueron depositados en un baño a 55°C durante aproximadamente 10 minutos, tiempo suficiente para que la agarosa se funda y disuelva.

3. Posteriormente se les añadió 5 μ l de la solución de silicagel, se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron en microcentrífuga a 15000 rpm durante 30 segundos, el sobrenadante fue descartado.

4. El pellet de silicagel, que contenía el ADN, fue lavado en 500 μ l de solución de lavado tres veces. En el último lavado es conveniente apurar al máximo la solución de lavado y secar ligeramente el pellet.

5. El pellet fue resuspendido en un volumen entre 10-20 μ l de agua bidestilada, se incubó durante 5 minutos a 55°C y se centrifugó durante 3 minutos.

6.Finalmente se descartó el pellet y se cogió la mayor parte del sobrenadante en el cual se encontraba el ADN. El sobrenadante debe de ser retirado con sumo cuidado para evitar el arrastre de silicagel, el cual podría interferir en posteriores ensayos.

1.2.LIGACION VECTOR/INSERTO.

El inserto, fase de lectura abierta del gen Mage-1, fue ligado al vector pGEX-2T mediante extremos cohesivos compatibles generados por la digestión enzimática BamHI/EcoR1. La digestión generó una polaridad en el inserto, de forma que únicamente existía una orientación de ligación posible con el vector. Esta consideración es importante, ya que se trata de un vector de expresión, y la orientación codificante del inserto es fundamental.

1.2.1.REACCION.

- 2 μ l de Vector digerido.
 - 5 μ l de Inserto digerido.
 - 1 μ l 10x buffer de ligación(0.1 M Cl_2Mg , 0.1 M DTT, 10 mM ATP, 0.3 M Tris-ClH pH 7.8) (*Promega*).
 - 1 U de T4 ligasa (*promega*).
- (10 μ l. de volumen final, 24 horas a 16°C).

1.3.TRANSFORMACION BACTERIANA.

1.3.1.GENERACION DE BACTERIAS COMPETENTES.

1.3.1.1.MATERIAL.

- Medio LB (Bacto Triptone-DIFCO- 1%, Bacto Yeast -DIFCO- 0.5%, NaCl 1% pH 7.5). Autoclavar.
- Solución 0.1 M Cl_2Mg filtrada.
- Solución 0.1 M Cl_2Ca filtrada.
- Glicerol.

1.3.1.2. METODO.

1. Se creció un alícuota de bacteria en 20 ml de medio LB hasta saturación.
2. Seguidamente el cultivo fue diluido 1/200 en 100 ml de medio LB y se cultivó en agitación a 37°C hasta una densidad óptica de 0.5 (550 nm).
3. Posteriormente el cultivo se puso en hielo y en agitación durante 3 min., seguidamente fue dividido en dos tubos de 50 ml y centrifugado a 2000 rpm (centrífuga JOUAN CR411) durante 10 minutos a 4°C.
4. El pellet bacteriano de cada tubo se resuspendió en 12.5 ml de Cl_2Mg 0.1 M y se mezcló en un único tubo en donde fue agitado en hielo durante 10 min.
5. Transcurrido este tiempo se centrifugó en las mismas condiciones anteriores

y el pellet fue entonces resuspendido en 25 ml de Cl_2Ca 0.1 M, el tubo se mantuvo en agitación y en hielo durante 20 minutos.

6. Finalmente las bacterias se centrifugaron y el pellet resuspendido en 5 ml de una solución CaCl_2 0.1 M + glicerol 20%. Las bacterias competentes fueron alicuotadas y congeladas rápidamente a -80°C .

1.3.2.CONFECCION DE PLACAS DE AGAR/AMPICILINA.

1.3.2.1.MATERIAL.

- Medio LB.
- Agar (*Oxoid L 11*).
- Ampicilina (*Gobemicina Lab. Normon S.A.*).

1.3.2.2.METODO.

El medio LB fue suplementado con agar al 1.5%, la mezcla fue autoclavada. El medio LB/AGAR se dejó enfriar hasta aproximadamente 50°C y se suplementó con ampicilina hasta una concentración de $100 \mu\text{g/ml}$ de medio. El medio fue vertido en placas de 20 cm en campana (aproximadamente 20 ml/placa) y se dejó solidificar.

1.3.3.TRANSFORMACION.

1.3.3.1.MATERIAL.

- E. coli (XL1-blue, Y1089, DH5 y SURE™) competentes.
- Medio SOC (LB suplementado con glucosa).
- Placas LB/Ampicilina.

1.3.3.2.METODO.

1. Para cada transformación se utilizaron 100 μ l de bacteria competente, la cual había sido descongelada lentamente en hielo.
2. Los 10 μ l de la reacción de ligación se diluyeron en 40 μ l de agua bidestilada, los 50 μ l resultantes se mezclaron con la bacteria competente y se incubaron en hielo durante 30 minutos.
3. Posteriormente las bacterias fueron sometidas a un choque térmico, 42°C durante exactamente 45 segundo, y fueron puestas de nuevo en hielo. Las bacterias fueron recuperadas añadiendo 1 ml de medio SOC e incubando a 37°C durante 1 hora en agitación.
4. Transcurrido este tiempo, las bacterias transformadas, fueron centrifugadas a bajas revoluciones en microcentrífuga, resuspendidas en 100 μ l de LB y plaqueadas. Generalmente se plaquean 25 μ l por placa, y se incuba en estufa a 37°C durante aproximadamente 12 horas.

1.4.CONFIRMACION DE LA TRANSFORMACION BACTERIANA Y SECUENCIACION CONFIRMATIVA DEL INSERTO MAGE-1.

Varios clones fueron seleccionados y chequeados para la presencia de plásmido recombinante. Eran dos las confirmaciones que había que hacer: determinar la presencia del inserto y comprobar que se trataba de Mage-1.

1.4.1.EXTRACCION DE PLASMIDO (MINIPREBS).

1.4.1.1.MATERIAL.

- Diversos clones de las bacterias transformadas
- Medio LB/Ampicilina.
- Kit Magic Miniprebs (*Promega*).

1.4.1.2.METODO.

1. Las colonias fueron crecidas de forma independiente en 25 ml de medio LB/Ampicilina hasta saturación. Se utilizó 3 ml de cultivo para la extracción de plásmido.

2. Este volumen fue centrifugado, en tubos eppendorf, a 6000 rpm en microcentrífuga, el sobrenadante fue descartado.

3. El pellet bacteriano se resuspendió en 200 μ l de solución de resuspensión, se añadieron 200 μ l de solución lisis y se agitó ligeramente. Finalmente se completó con 200 μ l de solución neutralizante, se dejó en reposo unos minutos y se centrifugó

a alta velocidad durante 15 minutos.

4. El sobrenadante fue recogido en un nuevo tubo y se añadió 1 ml de resina, transcurridos 5 minutos la resina se pasó por columna, que fue lavada con 2 ml de solución de lavado.

5. La columna se centrifugó para eliminar los restos de esta solución y posteriormente se pasó 50 μ l de agua bidestilada a 55°C. Este volumen, que contiene el plásmido, fue recogido en un eppendorf tras centrifugación.

1.4.2.DIGESTION ENZIMATICA DEL PLASMIDO.

1.4.2.1.REACCION.

- 1 μ g de plásmido pGEX-2T-MAGE1.
- 2 μ l de 10x buffer B (*Boehringer*).
- 10 U de BamH1 (*Boehringer*).
- 10 U de EcoR1 (*Boehringer*).

(20 μ l de volumen final, 37°C durante 1 hora).

La digestión enzimática fue chequeada en gel de agarosa al 2%.

1.4.3.SECUENCIACION DEL INSERTO MAGE-1.

Se ha utilizado el método de secuenciación derivado del método enzimático de Sanger y cols. 1977. En este método se utilizó el ADN de cadena sencilla,

objeto de la secuenciación, como molde para la síntesis "in vitro" de cadenas complementarias.

La síntesis se inicia a partir del cebador o "primer" que se une de forma específica al ADN, y termina por la incorporación de un nucleótido de terminación (2'-3' dideoxynucleósido 5' trifosfato: ddNTP) que carece del 3'OH necesario para que continúe la elongación de la cadena.

El fundamento de la técnica consiste en usar una mezcla de dNTPs adecuada y uno de los cuatro ddNTPs, que determina el "STOP" de la elongación allí donde se incorpora, generando de ésta forma un número de cadenas de tamaño dispar, dependiendo de la distancia entre el cebador y el lugar en donde se incorpore el ddNTP.

Se hacen, por tanto, cuatro reacciones separadas (ddCTP, ddTTP, ddATP y ddGTP). La visualización de las distintas cadenas sintetizadas se realiza, previa electroforesis de alta resolución, mediante autoradiografía, ya que en la reacción inicial de elongación se utiliza un nucleótido marcado radiactivamente.

1.4.3.1.MATERIAL

- Kit DNA secuenase (USB).
- cebador utilizado: Oligonucleótido GST.
- ³⁵S dATP (NEG 034 H Dupont).
- Solución TBE 10x (1 M Tris-borato, 0.02 M EDTA pH 8.0).

- Gel de poliacrilamida 6 % (6 % acrilamida:bisacrilamida 19:1, 50 % urea, TBE 0.5x, persulfato amónico 0.025 %, TEMED 0.1 %).

1.4.3.2.METODO.

1. Primeramente se realizó una desnaturalización alcalina del ADN de doble cadena. A una cantidad de 2-4 μg de ADN se le añadió 2 μl de EDTA 1 mM, NaOH 2 mM y agua bidestilada hasta 20 μl . Se dejó 5 min. a temperatura ambiente y posteriormente se incubó sobre hielo durante 2 min.. A continuación se añadió 7 μl de agua bidestilada, 3 μl de ACONa 3M pH 4.8 (para neutralizar la mezcla) y se precipitó el ADN añadiendo 75 μl de etanol frío. La mezcla se dejó durante 20 minutos a -80°C , para que la precipitación sea más efectiva, posteriormente se centrifugó en microcentrífuga durante 15 min., se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol al 80%. Finalmente se secó al vacío.

2. El siguiente paso lo constituye la hibridación de ADN con el cebador específico: se redisolvió el ADN en 7 μl de agua bidestilada, 2 μl de tampón de secuenciación y se añadió 1 μl de cebador GST (2 ng/ μl). La mezcla se calentó durante 2 min. a 65°C y dejó enfriar por debajo de 35°C , seguidamente la muestra dejó en hielo hasta su uso.

3. Reacción de marcaje: Se diluyó la mezcla de marcaje 1:5 con agua bidestilada. La enzima Secuenase (USB)(ADN polimerasa) se diluyó en un tampón

de dilución (tampón 5x: 200 mM Tris-ClH pH 7.5, 100 mM Cl_2Mg , 250 mM ClNa). A 10 μ l de ADN hibridado con el cebador, se añadió 1 μ l de 0.1 M DTT, 2 μ l de mezcla de marcaje diluida (7.5 μ M dGTP, 7.5 μ M de dCTP, 7.5 μ M dTTP), 0,5 μ l de ^{35}S dATP y se incubó a temperatura ambiente durante 2 a 5 min.

4. Reacción de terminación: previamente se habían preparado los cuatro tubos con las cuatro mezclas de terminación (2,5 μ l de cada mezcla de terminación en cada tubo: ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) en frío y se taparon para evitar la evaporación. Cada mezcla de terminación llevaba igual concentración de los 4 dNTPs y el correspondiente nucleótido terminador ddNTP. Las mezclas de terminación se calentaron en un baño a 37 °C, al menos durante 1 min., y cuando la reacción de marcaje se había completado se añadieron 3.5 μ l de mezcla de marcaje a cada tubo de terminación denominados como G/A/T/C. Las mezclas de terminación se incubaron a 37°C durante 5 min., posteriores se pararon añadiendo 4 μ l de solución de parada (95% de formamida, 20mM de EDTA, 0,05% azul bromofenol y 0,05% xilenocianol).

5. Electroforesis en gel desnaturalizante: Inmediatamente antes de cargar las muestras en el gel, se calentaron 2 min. a 75°C. El gel de poliacrilamida se preparó de 2 a 20 horas antes de su uso, y se precalentó de 15 a 60 minutos a 100 W antes de la electroforesis de las muestras. Las muestras se sometieron a 100 W durante 5 hrs. (el tampón de electroforesis fue TBE x1). Transcurrido este tiempo se lavó el gel en una solución de ácido acético al 10%, entre 10 y 15 min., posteriormente

el gel se secó sobre papel 3MM en un secador de geles, y se realizó la autorradiografía.

2.PRODUCCION A GRAN ESCALA DE LA PROTEINA RECOMBINANTE

MAGE-1.

2.1.INDUCCION.

Una vez confirmada la presencia del inserto e identificado como el antígeno Mage-1, se procedió a obtener la proteína recombinante induciéndola en cultivo bacteriano mediante el inductor IPTG.

2.1.1.MATERIAL.

bacterias:

- E.coli XL1-Blue.
- " Y1089.
- " DH5.
- " SURE™.
- " f900.

inductor:

- IPTG (isopropyl- β -D-thio-galactopyranosido) 0,5M.

medio de cultivo:

- Medio LB/ampicilina.

2.1.2.METODO.

1. La bacteria recombinante se cultivó en un volumen de 200 ml de medio LB/Ampicilina durante aproximadamente 12 hrs. a 37°C y en agitación.

2. los 200 ml de cultivo bacteriano saturado fueron diluidos 1/10 en le mismo medio hasta 2 litros finales, el cultivo se mantuvo a 37°C hasta que la densidad óptica fue de 0,5 a una longitud de onda de 599 nm.

3. A esta longitud de onda se añadió el IPTG hasta una concentración final de 0,1 mM, y se bajó la temperatura hasta 25°C. En estas condiciones el cultivo se mantuvo durante 3 hrs..

2.2.PURIFICACION DE LA PROTEINA RECOMBINANTE MAGE-1.

2.2.1.ANALISIS DEL EXTRACTO BACTERIANO.

Previo a la purificación de la proteína recombinante se realizó un chequeo del extracto bacteriano mediante electroforesis SDS-PAGE (10% de acrilamida), para asegurarnos de que la inducción había ido correctamente.

2.2.1.1.MATERIAL.

- Cubeta BIORAD MINIPROTEAN.
- Tampón de electroforesis (25 mM Tris-ClH,
250 mM Glicina, 0.1% SDS).

- Tampón de carga (2,3% SDS, 5% 2-β-mercaptoetanol, 62,5 mM Tris HCl pH 6.8, 10% glicerol y 0.05% azul de bromofenol).
- "Stack gel" (4% acrilamida:bisacrilamida 37.5:1, 0.125 M Tris-ClH pH 6.8, 0.1% SDS, 0.05% Persulfato amónico, 0.1% TEMED).
- "Resolving gel" (7.5% acrilamida:bisacrilamida 37.5:1, 0.375 M Tris-ClH pH 8.8, 0.1% SDS, 0.05% Persulfato amónico, 0.05% TEMED).
- Solución de tinción (0.25% Azul de Coomasie, Metanol:agua 1:1).
- Solución de destinción (30% Metanol, 10% Ac. Acético).

2.2.1.2.METODO.

1. El extracto de proteína bacteriana para analizar se obtuvo de 1 ml de cultivo inducido, y de forma paralela de 1 ml de cultivo basal. El pellet bacteriano fue resuspendido en 100 µl de agua bidestilada y posteriormente se le añadió 100 µl de tampón de muestra 2x, la muestra fue calentada a 95°C durante 5 min.

2. Se analizaron 5 µl de muestra. El gel se sometió a una diferencia de potencial de 100 V. durante aproximadamente 1 hora.

3. El revelado del gel se realizó mediante tinción con azul de coomasie durante 10 minutos, posteriormente se lavó con solución de destinción durante 5 min. Previamente al secado del gel en vacío se aumentó el contraste sumergiendo el gel durante 24 horas en una solución de acético al 10%.

2.2.2.PURIFICACION DE LA PROTEINA RECOMBINANTE.

La purificación se realizó mediante columna de afinidad. El fundamento de la técnica radica en la retención de forma específica de la proteína recombinante en la trama que forma el sephadex mediante la existencia de un ligando específico, en este caso glutation, que se une de forma específica a la proteína de fusión Glutation-S-transferasa.

2.2.2.1.MATERIAL.

- Columna Prepacked Glutathione Sepharose® 4B (Pharmacia).
- Sonicador.
- Tampón PBS (150 mM ClNa, 16mM PO₄HNa₂, 4mM PO₄H₂Na pH 7.3).
- Tritón X-100 10%.
- Solución de Glutation (5mM Glutation reducido, 50mM Tris-HCl pH 8.0).
- Trombina humana (Sigma).

- Tampón de lavado (150 mM ClNa,
50 mM Tris-ClH pH 7.5).
- Tampón de trombina (2,5 mM de Cl₂Ca en tampón de
lavado).

2.2.2.2.METODO.

1. Una vez finalizada la inducción, el cultivo bacteriano fue centrifugado en alícuotas de 500 ml en una centrífuga tipo JOUAN K110 SX a 2500 rpm durante 20 min. y a 4°C.
2. El sobrenadante fue desechado y el pellet bacteriano de cada alícuota se resuspendió en 5 ml de solución PBS/Tritón-100 1% en frío. La sonicación de los 20 ml de suspensión bacteriana se llevó a cabo en hielo.
3. El sonicado fue posteriormente alicuotado en tubos eppendorf y centrifugado en microcentrífuga a 13000 rpm durante 5 min.. Se recuperó el sobrenadante y se filtró utilizando una jeringa y filtros de 0.45 μm de poro (*Millipore*). El sobrenadante estaba constituido por las proteínas hidrosolubles, entre las que se encontraba la proteína de fusión GST-Mage-1.
4. Antes de pasar el extracto por la columna de afinidad, ésta se equilibró con PBS/Tritón X-100 1%. La columna se acopló a un soporte de forma vertical y se dejó escurrir la solución de preservación (etanol 20%).
5. Por el extremo superior se añadió el tampón de lavado hasta un volumen

de 10 ml, una vez que la columna había sido equilibrada se añadió poco a poco la solución de extracto bacteriano. En este proceso la proteína recombinante quedó unida mediante la glutatión-S-transferasa a su sustrato glutatión que se encontraba unido a las bolas de sephadex, y el resto recorrió la longitud de la columna hasta salir por el extremo inferior. El extracto sobrante se volvió a pasar de nuevo por la columna.

6. Finalmente la columna se lavó mediante tampón PBS/Tritón X-100 1% (10 ml), para arrastrar posibles retenciones inespecíficas.

7. La recuperación de la proteína recombinante se realizó añadiendo a la columna tampón glutatión, el cual contenía glutatión reducido en una concentración mucho mayor a la que se encontraba en la columna, de esta forma el glutatión libre arrastró a su paso la proteína recombinante. El eluido de la columna se recupera en fracciones de 1 ml.

8. Las distintas fracciones del eluido fueron cuantificadas (bracford BIORAD) para determinar en cual de ellas se encontraba la mayor parte de la proteína. La fracción que contenía la mayor concentración fue analizada en gel de poliacrilamida (apartado 2.2.1).

9. La proteína recombinante Mage-1 se separó de la proteína de fusión GST mediante digestión con trombina. La columna saturada con la proteína recombinante se lavó con tampón PBS/Tritón X-100 1% 10 ml. Posteriormente se equilibró con tampón de lavado y una vez con tampón de trombina 10 ml.

10. Las bolas de sephadex se resuspendieron en un volumen de aproximadamente 1 ml de tampón de trombina, se añadió 150 ng de trombina humana por cada 50 μg de proteína de fusión y se incubó en agitación a 25°C durante 30 minutos.

11. El eluido que se obtuvo transcurrido este tiempo contenía la proteína recombinante MAGE-1.

3.OBTENCION DE ANTISUERO FRENTE A LA PROTEINA RECOMBINANTE MAGE-1.

3.1.INMUNIZACION CON PROTEINA RECOMBINANTE MAGE-1.

La inmunización se llevó a cabo utilizando la proteína recombinante completa GST-Mage-1, lo que hizo necesario establecer un control con la proteína de fusión GST. Se utilizaron ratones de la raza Balb/C y pollos.

3.1.1.MATERIAL.

- 5 Ratones Balb/C.
- 3 Pollos (Gallus domesticus).

3.1.2.METODO.

Como coadyuvante se utilizó el coloide Alúmina (hidróxido de aluminio), que fue mezclado con la proteína, previa inmunización.

Ratones.

Las inyecciones se hicieron intraperitonealmente durante 30 días, a intervalos de 7 días, y con 40 μ g de proteína en cada inyección. La distribución del material para el protocolo de inmunización fue la siguiente:

- 2 ratones fueron inmunizados con la proteína recombinante GST-Mage-1.

- 2 ratones fueron inmunizados con la proteína GST.
- 1 ratón se utilizó como control no inmune.

Pollos.

Las inyecciones se hicieron intramuscularmente durante 45 días, a intervalos de 15 días, y con 200 μ g de proteína en cada inyección. La distribución del material para el protocolo de inmunización fue el siguiente:

- 1 pollo fue inmunizado con la proteína recombinante GST-Mage-1.
- 1 pollo fue inmunizado con la proteína GST.
- 1 pollo se utilizó como control no inmune.

3.2.OBTENCION DEL ANTISUERO.

Para la obtención del antisuero los animales fueron sacrificados. El suero de ratón se obtuvo coagulando la sangre a 37 °C, centrifugándola y descartando el coágulo. En el caso de los pollos se procedió de la misma manera, aunque debido al mayor volumen de sangre extraído se procedió a purificar de forma específica las inmunoglobulinas reactivas frente a la proteína de fusión.

3.3.LIMPIEZA DEL ANTISUERO DE INMUNOGLOBULINAS NO ESPECIFICAS Y REACTIVAS FRENTE A LA GST.

Debido a que la inmunización se llevó a cabo con la proteína de fusión, cabría esperar la producción de inmunoglobulinas específicas frente a la porción GST. De igual forma durante la purificación de la proteína de fusión, a partir de extractos bacterianos, se podían haber arrastrado restos de proteínas bacterianas que provocarían una respuesta inmune muy fuerte, y por tanto la existencia de anticuerpos no específicos en el suero.

Tanto la existencia de anticuerpos específicos frente a GST como la presencia de anticuerpos reactivos frente a proteínas bacterianas, interferirían en análisis posteriores realizados con el antisuero, enfocados todos ellos al reconocimiento específico de la proteína Mage-1.

Por este motivo se decidió hacer una limpieza del suero total, inmunoabsorbiendo con extractos bacterianos que expresaran la GST, de tal forma que la posterior purificación del antisuero fuese lo mas específica posible.

3.3.1.MATERIAL.

- E.coli XL1-Blue. transfectada con el plásmido pGEX-2T.
- 0.9% ClNa.
- Acetona (*Merck*).

3.3.2.METODO.

1. La bacteria fue crecida hasta saturación y posteriormente inducida para producir GST (apartado 2.1) en un volumen de 100 ml. Transcurridas 3 horas el cultivo fue centrifugado y las células fueron resuspendidas en 1 ml. de solución salina, en la cual permanecieron durante 5 min. en hielo.

2. Se añadieron 4 ml. de acetona a -20°C , se mezcló vigorosamente y se incubó durante 30 min. mezclando vigorosamente cada 5 min.

3. El precipitado es recolectado por centrifugación a 13000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue descartado.

4. El pellet fue resuspendido con acetona fresca (-20°C), se mezcló vigorosamente y se dejó en hielo durante 10 min.

5. El precipitado fue nuevamente centrifugado, el pellet fue transferido a una hoja limpia de papel de filtro y se dejó secar a temperatura ambiente. El pellet seco es dispersado.

6. El polvo seco fue transferido a un tubo eppendorf y los trozos mayores fueron descartados.

7. Para usar los polvos de acetona, se añadieron al suero hasta una concentración final del 1%. Se incubó durante 30 min. a 4°C y se centrifugó durante 10 min. El sobrenadante fue utilizado para purificar el antisuero específico.

3.4.PURIFICACION, A PARTIR DEL SUERO DE POLLO, DEL ANTISUERO ESPECIFICO.

La purificación se llevó a cabo mediante columna de afinidad. La columna estaba compuesta por sephadex, al cual estaba unida la proteína de fusión. El fundamento de la técnica consiste en la purificación de las inmunoglobulinas específicas anti-proteína de fusión mediante la interacción anticuerpo/antígeno que se establece cuando se hace pasar el suero por la columna. De esta forma se consigue concentrar la mayor parte de las inmunoglobulinas específicas unidas a la trama del sephadex, para posteriormente recuperarlas mediante un cambio de pH que inestabiliza la interacción Ac-Ag.

3.4.1.PREPARACION DE LA COLUMNA INMUNOABSORBENTE.

3.4.1.1.MATERIAL.

- CNBr-activated Sepharose[®] 4B (Pharmacia).
- Proteína de fusión GST-Mage-1 10 mg.
- ClH 1 mM.
- Solución A (CO₃HNa 0,1 M, ClH 0,5 M pH 8.3).
- Solución B (CO₃HNa 0,1 M, glyclilglycina 0,5 M).
- Solución C (CO₃HNa 0,1 M).
- Tampón Glycina-ClH 0,05 M pH 2.9.

- Tampón Tris-ClH 0,1 M pH 7,95.

3.4.1.2.METODO.

1. Previamente la proteína recombinante, aproximadamente 10 mg., fue dializada frente a la solución A.

2. 0.5 grs. de Sepharosa 4B-CNBr se mezclaron con 150 ml de ClH 1 mM durante 15 min. a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo la solución se filtró

y la sepharosa se lavó con 200 ml de agua destilada.

3. La sepharosa húmeda se resuspendió en 10 ml de solución A que contenía la proteína recombinante y se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente. La solución se filtró y el sobrenadante se analizó para asegurarse de que la proteína había quedado unida al gel.

4. La sepharosa se resuspendió en 10 ml de solución B y se agitó nuevamente durante 2 horas a temperatura ambiente.

5. Finalmente en pasos sucesivos la sepharosa/proteína recombinante fue lavada y filtrada en: 200 ml de solución C, 200ml de agua destilada, 100 ml de tampón Glycina-HCl, 100 ml de agua destilada y 100 ml de tampón Tris-HCl; siendo en este último tampón en el cual la sepharosa fue localizada en la columna.

3.4.2.PURIFICACION DE LOS ANTICUERPOS CON EL INMUNOABSORBENTE ESPECIFICO.

3.4.2.1.REACTIVOS.

- Solución TBST (0.05 M Tris-ClH, 0.4 M ClNa, 0.05 % Tween 20).
- Tampón fosfato PBS/Azida sódica 0.1 %.

3.4.2.2.METODO.

1. El suero fue diluido 1/2 en solución TBST. En estas condiciones se hizo pasar por la columna de sephadex varias veces, para saturar la columna con las inmunoglobulinas específicas.
2. La columna se lavó con TBST hasta que la presencia de proteína en el eluído fue mínima (se mide a $A_{280 \text{ nm}}$).
3. Las inmunoglobulinas fueron eluidas en tampón Glycina-ClH pH 2.9 y recogidas en fracciones de 1 ml, en tubos que contenían 500 μl de tampón Tris-HCl pH 7.95.

4. El eluido final fue titulado, estabilizado con albúmina, alicuotado y liofilizado frente a Tampón fosfato/Azida sódica. Previamente a la estabilización y liofilización del antisuero, se procedió a analizar el eluido mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (apartado 2.2.1), para determinar la presencia de las cadenas pesadas y ligeras que demostraran la existencia en el eluido de inmunoglobulinas.

4. ENSAYOS REALIZADOS CON LOS ANTISUERO.

4.1. WESTERN BLOT.

Con este ensayo se pretendió asegurar que los anticuerpos purificados reconocían la proteína recombinante frente a la cual se habían producido, y si eran capaces de reconocer la proteína Mage-1 nativa en extractos celulares positivos para la expresión del antígeno.

4.1.1. MATERIAL.

- Cubeta de transferencia (*SEMI-PHORTM-Hoefer*).
- Membrana de nylon Roll (*Hoefer*).
- Papel Watman 3MM.
- Solución de TBS 10x (1.5 M ClNa, 0.1 M Tris-ClH pH 8.0).
- Albúmina (*Sigma*).
- Tween 20.
- Azida sódica 10%.
- Antisuero específico.
- IgG biotinilada anti-ratón/anti-pollo (*Boehringer*).
- Streptavidina-PA (*Boehringer*).
- Tampón PA (5 mM Cl₂Ca, 100 mM ClNa, 100 mM Tris-ClH pH 9.5).
- NBT (Nitroblue tetrazolium) (*Boehringer*).

- BCIP (5-Bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato) (*Boehringer*).
- Solución bloqueante (TBS 1x, albúmina 3%, Tween 20 0.05%, Azida sódica 0.2%).
- Solución de incubación (TBS 1x, albúmina 1%, Tween 20 0.05%, Azida sódica 0.2%).
- Solución de revelado (66 μ l de NBT, 33 μ l de BCIP en 10 ml de tampón PA).

4.1.2.METODO.

1. Los extractos proteicos fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) (apartado 2.2.1).
2. Después de una hora las proteínas separadas en el gel fueron transferidas a una membrana de nylon en cubeta de transferencia durante una hora (0.8 mA/cm² de gel).
3. La membrana se incubó toda la noche en la solución bloqueante, con el fin de saturar los poros libres de la membrana con proteína no específica.
4. Posteriormente la membrana se puso en contacto con el antisuero específico, diluido 1/50 en solución de incubación, durante 2 horas a temperatura ambiente.
5. Dependiendo de la naturaleza del primer antisuero, ratón o pollo, el segundo anticuerpo reconocía la fracción constante de las inmunoglobulinas de una

especie u otra, en ambos casos este segundo anticuerpo se encontraba biotinilado. La segunda incubación se realizó con este anticuerpo, diluido 1/200 en la misma solución, durante 1 hora e igualmente a temperatura ambiente.

6. La tercera incubación se realizó con streptavidina conjugada con fosfatasa alcalina, diluida 1/5000 igualmente en solución de incubación y a temperatura ambiente durante 30 minutos.

7. Antes de cada incubación la membrana se lavó en solución de lavado, al menos dos veces durante 5 minutos.

8. Finalmente la membrana fue ligeramente secada y revelada en solución de revelado durante 10 minutos y en obscuridad.

4.2.INMUNOPRECIPITACION.

Con esta técnica se pretendía detectar la proteína nativa Mage-1 en condiciones no desnaturizantes y en extractos celulares de líneas que se sabían positivas en la expresión del antígeno, de igual forma se utilizaron linfocitos como fuente de extractos celulares negativos. Las líneas celulares se cultivaron según condiciones que se verán más adelante (apartado 6).

4.2.1.MATERIAL.

- Albúmina sérica bovina (BSA)(*Sigma*).
- Proteína A sepharosa (*Pharmacia*).

- Translabel ³⁵S Metionina (5100605 ICN Radiochemical).
 - Nonidet P40 (Fucka).
 - Solución Amplify (Amersham).
 - IgG rabbit antiratón/antipollo.
 - Metanol (Merck).
 - Acido acético glacial (Merck).
 - Medio de cultivo RPMI sin metionina (Flow lab. 16-222-49).
- Se utilizó suero fetal dializado (libre de metionina).
- Tampón de lisis (10 mM Tris-ClH, NP-40 1%,
150 mM Cl Na, 1 mM EDTA).
 - Solución de lavado 1 (tampón de lisis + ClNa 0.5 M).
 - Solución de lavado 2 (tampón de lisis + SDS 0.1%).
 - Solución de lavado 3 (Tris-HCl ph 7.4 + NP-40 0.1%).

4.2.2.METODO.

Marcaje metabólico de las células con Metionina³⁵S.

1. Se utilizaron 5×10^7 células, que fueron recogidas del medio de cultivo y centrifugadas en tubos a 1500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue retirado y las células resuspendidas en 1 ml de medio RPMI sin metionina suplementado con 10% de suero fetal dializado, las células eran entonces incubadas durante 30 minutos en estufa de cultivo.

2. Seguidamente se añadió 100 μ Ci de 35 S Metionina y se incubaron durante 4 horas en estufa, agitando periódicamente para resuspender las células.

3. Finalmente, las células fueron lavadas 3 veces en tampón PBS frío.

Lisis celular.

1. Al pellet de células lavadas se añadió 1 ml de tampón lisis suplementado con PMSF, inhibidor de tripsina y BSA. En estas condiciones se incubaron durante 30 minutos en hielo.

2. Posteriormente fueron centrifugadas durante 5 minutos a 3000 rpm y el sobrenadante fue recogido, acto seguido se volvió a centrifugar en tubos eppendorf durante 15 minutos a 15000 rpm en microcentrífuga, y el sobrenadante fue nuevamente recogido.

3. Por último se midieron las c.p.m. en contador beta a partir de 10 μ l de solución de lisis.

Preparación de la proteína A sefarosa al 10%.

Se pesó 1 gr. de proteína A sefarosa y se añadió 10 ml de tampón de lisis, posteriormente se centrifugó y el pellet fue resuspendido hasta un volumen de 10 ml en tampón de lisis suplementado con 10% de BSA y ClNa 0.35 M.

Preabsorción e inmunoprecipitación.

1. Se incubaron 100 μ l de proteína A sefarosa con 3 μ l de suero normal de ratón o pollo (dependiendo del antisuero utilizado) durante 30 minutos en hielo. A continuación se lavó dos veces con tampón de lisis y se resuspendió en 100 μ l de

este mismo tampón.

2. Se añadió 100 μ l de proteína A/suero normal por cada mililitro de lisado y se incubó durante 1 hora en hielo.

3. Seguidamente se centrifugó durante 5 minutos a 15000 rpm en microcentrífuga y se recogió el sobrenadante al que se le añadió 115 μ l de ClNa 3 M y 3 μ l de antisuero específico, la mezcla se incubó durante 17 horas a 4°C en agitación.

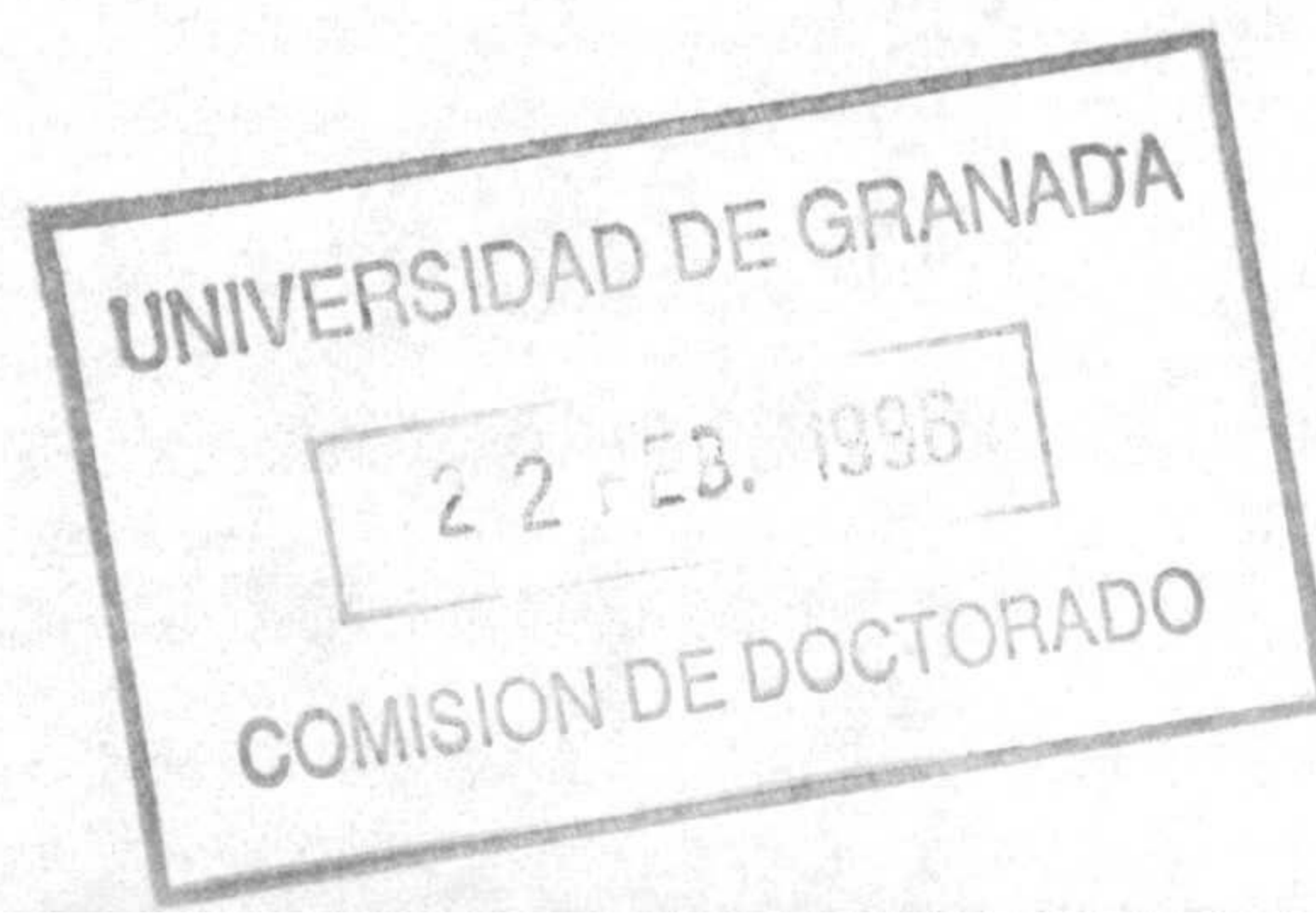
4. Transcurrido este tiempo se añadió 3 μ l de inmunoglobulina de conejo antiratón o antipollo, dependiendo del antisuero utilizado y se incubó durante 1 hora en hielo.

5. Posteriormente se añadió 100 μ l de proteína A sefarosa y se incubó durante 1 hora en agitación. Seguidamente se centrifugó a 15000 rpm durante 5 min. a 4°C y se recogió el sobrenadante.

6. El pellet se lavó con las soluciones de lavado 1, 2 y 3, centrifugando a 15000 rpm durante 1 min. y descartando el sobrenadante. Por último el pellet se resuspendió en 40 μ l de tampón de muestra.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

1. El gel de poliacrilamida se preparó al 10% (apartado 2.2.1) y las muestras fueron cargadas en el gel siendo previamente hervidas en el tampón de carga, centrifugadas y descartado el pellet.



2. La electroforesis tuvo lugar a una diferencia de potencial de 100 V durante aproximadamente 1 hora.

3. Transcurrido este tiempo el gel se introdujo en una solución de metanol 25% y ácido acético 10% durante 30 minutos, posteriormente permaneció 3 horas en solución Amplify. El gel fue rehidratado en agua durante 15 minutos, colocado sobre una hoja de papel Whatman 3MM e introducido en un secador de geles durante 2 horas a 80°C.

4. Finalmente, el gel seco se introdujo en un soporte de rayos X con una placa fotográfica y se dejó impresionar durante un tiempo adecuado a -80°C.

4.3.INMUNOHISTOQUIMICA.

Con este ensayo se pretendía identificar al antígeno Mage-1 en cortes histológicos parafinados y congelados de tejidos cancerosos y normales, así como en líneas celulares.

4.3.1.MATERIAL.

- N, N Dimetil formamida (*Sigma*).
- Fast Red TR Salt (*Sigma*).
- Hematoxilina de Harris (*Sigma*).
- Levamisole (*Sigma*).
- Medio de montar (*DIFCO*).

- Naftol AS-MX fosfato (*Sigma*).
- Suero humano AB.
- Inmunoglobulina de conejo anti-ratón y anti-pollo (*Dako*).
- Complejo soluble de fosfatasa alcalina e inmunoglobulina de ratón antifosfatasa alcalina (APAAP)(*Dako*).
- Solución de TBS x5 (Tris 0.5 M, NaCl 1.5 M pH 7.6).
- Cromógeno 10 ml (Naftol AS-MX fosfato 2mg,
Dimetilformamida 0.2 ml, Tris buffer 0.1 M ph 8.2 9.8 ml,
Fast Red TR salt 10 mg, levamisole 15 μ l).

4.3.2.TECNICA DE INMUNOFOSFATASA ALCALINA.

Se siguió el método de Cordell (1984).

1. Las muestras congeladas a -20°C , se dejaron descongelar a temperatura ambiente y las muestras parafinadas fueron desparafinadas con xilol.
2. Los portas fueron situados en una cámara húmeda e incubados primeramente con el antisuero anti-MAGE-1 durante 1 hora.
3. Posteriormente se incubaron con el segundo anticuerpo (antiratón o antipollo) diluido 1/20, durante 30 minutos, y finalmente se incuban con el complejo APAAP diluido 1/50, durante el mismo tiempo. Las incubaciones se realizaron con el antisuero y los monoclonales diluidos en TBS x1 con un 25 % de suero AB. En

cada incubación los portas fueron lavados con TBS x1 durante 10 minutos.

4. El revelado de los tejidos se llevó a cabo con el cromógeno, que se filtró directamente sobre los cortes y se dejó actuar entre 10 y 15 minutos según la intensidad de la reacción. La reacción se paró con TBS y los portas se lavaron en agua destilada durante 2 minutos.

5. Los tejidos se contratiñeron con hematoxilina de Harris durante 30 segundos, se lavaron con agua corriente durante 2 ó 3 minutos y se montaron en medio Von Apathy.

6. Los cortes fueron valorados de forma semicuantitativa bajo microscopía óptica.

5. EXPRESION DE LA PROTEINA RECOMBINANTE MAGE-1 EN SISTEMA EUCARIOTA (BACULOVIRUS).

5.1. SUBCLONACION DE LA REGION CODIFICANTE DEL GEN MAGE-1.

El fase de lectura abierta fue subclonada en el vector pBlueBacHisA (*invitrogen*), para ello se partió del vector pGEX-2T-MAGE-1 en el cual se encontraba ya clonada. La subclonación se realizó en el punto BamHI/HindIII, y el nuevo fragmente se obtuvo mediante PCR.

5.1.1. MATERIAL.

- Oligonucleótidos utilizados:

MAGEFW BamHI
 5' AAGGATCC/CTTGAGCAGAGGAGTCTG 3'
EGAMH+ HindIII
 5' CGGAAGCTTTTA/TCAGACTCCCTCTTCCTC 3'

- Plásmido recombinante pGEX-2T-MAGE-1.

5.1.2. REACCION/CONDICIONES DE PCR.

Se utilizaron 100 ng de plásmido para obtener el fragmento amplificado con los extremos cohesivos BamHI/HindIII. La reacción se llevó a cabo en las mismas condiciones del apartado 1.1.2/1.1.3.

A partir de este punto, el protocolo seguido hasta la obtención del plásmido recombinante pBlueBacHisAMAGE-1, así como la posterior confirmación de la subclonación, fue el mismo que el seguido en el apartado 1.

5.2.OBTENCION Y PURIFICACION DE GRAN CANTIDAD DE PLASMIDO RECOMBINANTE CIRCULAR EN GRADIENTE DE CLORURO DE CESIO/BROMURO DE ETIDIO.

Esta purificación fue requerida, en primer lugar para obtener una gran cantidad de plásmido recombinante y en segundo lugar, porque algunos de los reactivos utilizados en la extracción convencional de plásmido podían interferir en el proceso de cotrasfección al que iba a ser sometido posteriormente el plásmido.

5.2.1.MATERIAL.

- Bacteria recombinante.
- Medio LB/Ampicilina.
- Solución de lavado (ClNa 0.1 M, Tris-ClH 10 mM pH 8.0, EDTA 1mM pH 8.0).
- Solución I (Glucosa 50 mM, Tris-ClH 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0).
- Solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1%).
- Solución III (AcOK 3 M, Ac. Acético glacial 11.5%).

- Solución de lisozima (10 mg/ml en Tris-ClH 10 mM pH 8.0).
- Isopropanol (*Merk*).
- TE pH 8.0.
- ClCs (*Merk*).
- Bromuro de Etidio (10 mg/ml).
- Butanol saturado con agua.

5.2.2.METODO.

1. Se cultivó un inóculo de bacteria recombinante en 30 ml de medio LB/ampicilina durante 12 hrs. a 37°C. El cultivo completo se inoculó en 500 ml de del mismo medio precalentado a la misma temperatura y se cultivó en agitación hasta una DO₆₀₀ aproximadamente 0.4.

2. Las bacterias fueron recolectadas y centrifugadas a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C, utilizando un rotor Sorvall GS3. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en 100 ml de solución de lavado fría, acto seguido se volvieron a centrifugar.

3. Las bacterias sufrieron una lisis alcalina. Después de lavado el pellet fue resuspendido en 10 ml de solución I, al que se le añadió 1 ml de solución de lisozima.

4. Seguidamente se añadió 20 ml de solución II. El recipiente se agitó varias veces por inversión y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos.

5. Finalmente se adicionó 15 ml de solución III. El recipiente se agitó varias veces y se localizó en hielo durante 10 minutos.

6. El lisado bacteriano se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C en un rotor Sorvall GS3.

7. El sobrenadante fue filtrado a través de papel de filtro y se le añadió 0.6 volúmenes de isopropanol, se mezcló bien y se dejó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente el plásmido fue recuperado por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente en un rotor Sorvall GS3.

8. El sobrenadante fue decantado y el pellet lavado con etanol 70% a temperatura ambiente. Una vez seco el pellet se resuspendió en 3 ml de TE.

9. La purificación del plásmido se llevó a cabo por centrifugación en gradiente de CICs/Bromuro de etidio. Por cada mililitro de solución de plásmido se añadió exactamente 1 gr. de CICs, la solución fue calentada hasta 30°C y mezclada suavemente hasta la total disolución de la sal.

10. Se añadió 0.8 ml de la solución de bromuro de etidio por cada 10 ml de la solución plásmido/CICs. La solución fue centrifugada en un rotor Beckman vertical Ti65 durante 16 horas a 45000 rpm, para ello se utilizó un tubo *Beckman Quick-Seal*.

11. Trascurrido este tiempo se pudieron observar en el tubo varias bandas que correspondían a distintos estados del plásmido, al ARN y a las proteínas residuales. Era la banda inferior la que correspondía al plásmido circular cerrado y fue recuperado utilizando una jeringa con aguja hipodérmica.

12. La extracción del bromuro de etidio se realizó con disolventes orgánicos. A la solución de ADN se le añadió un volumen igual de butanol saturado con agua y se mezclaron las dos fases por vortex. La mezcla fue centrifugada a 1500 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente.

13. La fase inferior acuosa fue recuperada y transferida a un nuevo tubo. La extracción fue repetida aproximadamente 4 veces, hasta que el color rosa desapareció de la fase acuosa.

14. La solución final fue diluida 3 veces con agua y el ADN fue precipitado con dos volúmenes de etanol durante 15 minutos a 4°C. Finalmente fue centrifugada a 10000 g durante 15 minutos a 4°C. El precipitado de ADN plasmídico fue disuelto en aproximadamente 1 ml de TE.

5.3.OBTENCION DE VIRUS RECOMBINANTE.

Todo el protocolo seguido, así como parte de los materiales y reactivos utilizados, para obtener el virus recombinante, cotrasfectar virus/plásmido, cuantificar partículas virales y expresar la proteína recombinante fueron facilitados por el kit XPRESS SYSTEM™ BACULOVIRUS PROTEIN EXPRESSION

(*invitrogen*).

5.3.1.ESTABLECIMIENTO DE LA LINEA CELULAR SF9

(*Spodoptera frugiperda*).

La línea Sf9 (*invitrogen*) se descongeló a 37°C y fue puesta en medio de cultivo *GRACE'S* (*Gibco*), suplementado al 10% con suero fetal, inmediatamente. El medio fue renovado en 30 min., una vez que las células se habían adherido al fondo. El cultivo fue establecido en 4 semanas, cambiando el medio cada 48 hrs. y manteniendo el cultivo en una estufa a 27°C y en ausencia de CO₂.

5.3.2.TRANSFECCION DE LAS CELULAS SF9.

5.3.2.1.MATERIAL.

- ADN lineal del virus salvaje (baculovirus).
- Plásmido purificado pBlueBacHisAMAGE-1.
- Solución de liposomas catiónicos.
- Línea celular Sf9.
- Medio Grace's (*GIBCO*).
- Placas de 60 mm.

5.3.2.2.METODO.

1. Se utilizaron células Sf9 en fase logarítmica ($1.5-2.5 \times 10^6$ células/ml). Se sembraron 2×10^6 células en medio completo Grace's en una placa de 60 mm y se esperó a que se adhiriesen al fondo, aproximadamente 30 minutos.

2. Para cada placa que iba a ser transfectada se preparó la siguiente mezcla de transfección: se tomó 1 ml de medio grace's y se introdujo en un eppendorf. A continuación se le añadió 1 μg de ADN viral lineal y 3 μg de plásmido recombinantes purificado en gradiente de cloruro de cesio. La solución de liposomas catiónicos fue agitada ligeramente y se añadió 20 μl a la solución de ADN/medio grace's, la mezcla se agitó (vortex) durante 10-15 segundos.

3. Se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.

4. Durante este período de incubación se quitó el medio de las placas y se reemplazó con 2 ml de medio Grace's sin suplementar.

5. Se quitó todo el medio Grace's y añadió 1 ml de mezcla de transfección, goteando sobre la placa.

6. Las placas se incubaron, con un ligera agitación, durante 4 horas a temperatura ambiente.

7. Seguido este período de agitación se añadió 1 ml de medio complementado con suero fetal al 10% a cada placa y se incubó a 27 °C en un ambiente húmedo durante 48 horas.

8. El medio fue recogido a las 48 horas post-infección y guardado a +4°C hasta que fue requerido, ya que contiene el stock de virus que se usará para la identificación del virus recombinante por ensayo de placa. De forma opcional se podía añadir a las placas nuevamente 3 ml de medio fresco e incubar nuevamente a 27°C durante 48 horas.

5.3.3.PURIFICACION EN PLACA DEL VIRUS RECOMBINANTE.

5.3.3.1.MATERIAL.

- Sobrenadante de transfección viral.
- Baculovirus agarosa.
- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosido (X-gal).
- Placas de 100 mm.

5.3.3.2.METODO.

1. Se preparó una solución de Baculovirus agarosa al 2.5 % en agua destilada. La solución se esterilizó y fue incubada a 50°C hasta que fue necesario.
2. Por cada 50 ml de agarosa preparada, se prepararon 50 ml de medio Grace's complementado en un bote de 100 ml estéril y se incubaron a 50°C hasta su utilización.

3. Se hicieron diluciones decimales del sobrenadante del virus, cada una de ellas en un volumen de 1 ml por placa. Era esencial que el inoculo viral fuese agitado vigorosamente antes de preparar las diluciones. Se plaquearon las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} .

4. Las células Sf9 fueron sembradas a una densidad de 5×10^6 células/placa en medio complementado. Las placas se agitaron lentamente en una plataforma móvil para distribuir las de forma uniforme. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y tras este tiempo fueron incubadas nuevamente, sin agitación, el mismo tiempo.

5. Por cada placa, se pusieron 5 ml de medio complementado en un tubo estéril de 15 ml. Este medio portaba el sustrato cromogénico X-gal ($150 \mu\text{g}/\mu\text{l}$).

6. El medio fue retirado de las células una vez que se habían adherido al fondo de la placa.

7. Se añadió 1 ml de cada dilución de virus a cada placa previamente rotulada. Posteriormente fueron incubadas en una plataforma con leve agitación a temperatura ambiente durante 1 hora.

8. Durante este período de incubación se calentó un baño de agua a 46°C y se localizó en una campana de flujo laminar.

9. Antes de terminar la hora de incubación, se retiró del autoclave la agarosa y el medio que había sido incubado a 50°C . Se combinó un bote de agarosa con un bote de medio, se mezcló y se colocó en el baño de agua.

10. Cuando se completó el período de incubación, el medio fue quitado de las placas. 5 ml de medio (con cromógeno) fue mezclado con 5 ml de la mezcla medio/agarosa. Inmediatamente se mezcló por inversión y se añadió a la placa lentamente desde el borde hasta cubrir la superficie.

11. Las placas se incubaron en un medio húmedo durante 5-6 días, o hasta que las placas estuviesen bien formadas, a 27°C.

12. En este tiempo aparecieron en las placas círculos azules que correspondían a clones del virus recombinante. En estas condiciones se eligió aquella placa en la cual estos clones estaban más separados y se visualizaron más independientes.

13. La purificación del virus recombinante se realizó picando algunas de estas colonias en el agar y re infectando con ellas 3 ml de cultivos de la línea Sf9 (5×10^6 células) en placa de 12 pocillos.

14. Transcurridos tres días se tomaron aproximadamente 0.75 ml de sobrenadante y se analizó para la presencia de virus recombinante mediante PCR.

5.3.4.ANALISIS DEL VIRUS RECOMBINANTE.

5.3.4.1.MATERIAL.

- Sobrenadante viral 0.75 ml.
- Polyethylene glycol (PEG-8000).

- ClNa 1 M.
- Proteinasa K (10 mg/ml).
- Phenol/Cloroformo 1:1
- AcONA 3 M.
- Glycogen (2 mg/ml).
- Oligonucleótidos:

Forward primer: 5'-TTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTG-3'

Reverse primer: 5'-CAACAACGCACAGAATCTAG-3'

5.3.4.2.METODO.

1. La muestra de sobrenadante fue centrifugada en microcentrífuga a 5000 rpm durante 3 minutos para quitar los restos celulares.
2. El sobrenadante se añadió a un tubo limpio y se adicionaron 0.75 ml de una solución de 20% de polyethylene glycol en ClNa 1M, la mezcla se homogenizó por inversión y se dejó reposar durante 30 minutos.
3. La mezcla fue centrifugada a 14000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se quitó todo el medio del pellet y se resuspendió en 100 μ l de agua estéril.
4. Se añadió 10 μ l de proteinasa K y se incubó a 50°C durante 1 hora.
5. La extracción se realizó con igual volumen de phenos:cloroformo, centrifugando en un eppendorf durante 5 minutos y transfiriendo la fase acuosa a un

nuevo tubo estéril.

6. El ADN fue precipitado añadiendo 1/10 de 3 M AcONa, 5 μ l de glycogen y 2 volúmenes de etanol 100%. Se incubó a -20°C durante al menos 20 minutos.

7. Se centrifugó a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El pellet se lavó con etanol al 80% y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos para quitar las trazas de etanol.

8. Finalmente, el pellet fue resuspendido en 10 μ l de agua destilada y el ADN sometido al análisis por PCR. 5 μ l de ADN fueron sometidos a ensayo utilizando los primers descritos anteriormente y el buffer y dNTPs a las concentraciones indicadas en el apartado 1.1.2.

5.3.4.3.CONDICIONES DE PCR.

La PCR se llevó a cabo en un termociclador *Perkin Elmer Cetus elements* en las condiciones siguientes: (94°C 5 minutos) x 1 ciclo, (94°C 1 minuto, 55°C 2 minutos, 72°C 2 minutos) x 30 ciclos, (72°C 10 minutos) x 1 ciclo.

5.3.5.OBTENCION DE GRAN CANTIDA DE VIRUS RECOMBINANTE.

El stock del virus recombinante puro, 100 μ l, se puso en contacto con 2 x 10⁶ células Sf9 hasta que el 90% de las células se lisaron (4-5 días). El stock obtenido de esta infección se utilizó para infectar 500 ml de células Sf9 sembradas

a densidad de 2.5×10^6 células/ml en un frasco de 1 litro. El cultivo se incubaba en agitación constante durante 5 a 7 días.

5.3.6.DETERMINACION DEL TITULO VIRAL.

Para obtener una infección sincronizada, o para infectar las células a una multiplicidad de infección particular, era esencial saber la concentración de virus en el inóculo.

1. Se prepararon diluciones decimales 10^{-1} a 10^{-8} en medio completo.
2. Se realizó un ensayo en placa como el realizado en el apartado 5.3.3. 3.

Se realizó un conteo de placas coloreadas. El número óptimo era de 50-100 por placa.

4. El título se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{pfu/ml} = (1/\text{dilución}) \times \text{número de placas.}$$

5. Para determinar la multiplicidad de infección (MOI):

$$\text{ml de inóculo necesario} = [\text{MOI}(\text{pfu/célula}) \times \text{n}^{\circ} \text{ células}]/[\text{pfu/ml}].$$

5.4.OBTENCION DE EXTRACTOS CELULARES CON PROTEINA RECOMBINANTE.

1. Se sembraron 50 ml de células Sf9 a una densidad de 2×10^6 células/ml. Se infectó el frasco con el virus recombinante a MOI de 5 y durante 2 a 3 días se tomaron muestras cada 12 horas.

2. Las muestras fueron centrifugadas en tubos eppendorf y el pellet resuspendido en 100 μ l de buffer fosfato 20 mM a pH neutro.

3. Las células fueron congeladas en nitrógeno líquido y calentadas a 42°C de forma alternativa hasta que las células se lisaron, posteriormente fueron centrifugadas a máxima velocidad en microcentrífuga durante 10 minutos. El sobrenadante fue separado del pellet.

4. El análisis de los extractos se realizó en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (apartado 2.2.1).

6.DESCRIPCION Y CULTIVO DE LINEAS CELULARES.

Se han utilizado varias líneas tumorales de origen diferente:

- K562 (eritroleucemia), en sus dos variantes, K562A (American Type Culture Collection -ATCC-, Rockville, MD) y K562B (Instituto Ludwig para la Investigación del Cáncer).
- HL60 (leucemia promielocítica) (ATCC).
- MZ2-MEL3.0 (melanoma) (Instituto Ludwig para la Investigación del Cáncer).
- COLO668 (carcinoma de células pequeñas de pulmón) (Dr. F.X. Real del Institut Municipal d'Investigació Mèdica Barcelona).
- LB37 (carcinoma de pulmón) (Instituto Ludwig para la Investigación del Cáncer).
- LB23 (sarcoma) (Instituto Ludwig para la Investigación del Cáncer).

Todas las líneas fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Laboratorios Gibco, Grand Island, N.Y.) suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado (Flow lab. 29-101-49) glutamina 4 mM, penicilina 50 u/ml y gentamicina (GENTA-GOBENS) 50 u/ml. La incubación se llevó a cabo en una estufa a 37°C y con una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad. Algunas de las líneas tumorales crecían adheridas relativamente fuerte al frasco de cultivo (Greiner 658170), en este caso para duplicar la población celular, las células fueron incubadas durante 5 minutos a 37°C con 2-5 ml de PBS (tampón fosfato) con 0.02% de EDTA.

7. TRATAMIENTO DE LAS LINEAS CON DIFERENTES AGENTES

QUIMICOS.

Las línea K562A fue tratada con los siguientes moduladores: AraC (*Upjohn*) 1 μ M, PMA (*Sigma*) 10 nM y Hemina (*Sigma*) 50 μ M. Los diferentes moduladores se añadieron al cultivo cuando las células se encontraban en crecimiento exponencial y durante 72 hrs., transcurrido este tiempo las células fueron lavadas en tampón fosfato y sometidas a los diferentes análisis.

Las líneas HL60, LB23 y LB37 fueron tratadas con el agente desmetilante 5-Aza-2'-deoxicitidina (DAC) (*Sigma*) a una concentración de 3 μ M durante 3 días. La droga fue añadida al cultivo en estado exponencial y cada día fueron lavadas en tampón fosfato y puestas en contacto nuevamente con el agente.

8.DETERMINACION DE LA EXPRESION DEL GEN MAGE-1 EN LAS DIFERENTES LINEAS.

8.1.EXTRACCION DE ARN TOTAL.

8.1.1.MATERIAL.

Se ha utilizado el método Micro RNA isolation kit (*Stratagene*) que incluye las siguientes soluciones:

- Solución desnaturizante.
- Acetato sódico 2M pH 4.0.
- Cloroformo:alcohol isoamílico.
- Isopropanol.
- Fenol saturado con agua.
- β mercaptoetanol 1 M.

8.1.2.METODO.

Todo el material ajeno al kit se trató con dietil pirocarbamato 0.01 % (*sigma*).

1. Se utilizaron 5 millones de células, que lavadas en tampón fosfato y centrifugadas fueron puestas en un tubo eppendorf.
2. Seguidamente se añadió 500 μ l de solución desnaturizante y 3,6 μ l de β -mercaptoetanol, se agitó levemente y se adicionó 50 μ l de acetato sódico 2 M pH

4.0. Finalmente se añadió 500 μ l de fenol, 100 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico y se agitó vigorosamente.

4. Se centrifugó a alta velocidad en microcentrífuga durante 15 minutos, posteriormente se retiró la fase acuosa, en donde estaba el ARN, y se situó en un tubo eppendorf libre de RNasa.

5. A este volumen se le añadió 500 μ l de isopropanol, se mezcló bien y se centrifugó a alta velocidad durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante, el pellet de ARN fue lavado con 0.5 ml de etanol al 70% y secado al vacío durante 5 minutos.

6. El ARN fue resuspendido en 50 μ l de agua tratada con dietil pirocarbamato y cuantificado a 260 nm, la calidad del ARN fue también chequeado en gel de agarosa 3%.

8.2.SINTESIS DE ADNc.

8.2.1.MATERIAL.

- Kit Reverse Transcription System (*Promega*).
- ARN total (2 μ g).

8.2.2.METODO.

En un tubo de 0.6 ml (de PCR) se añadió por orden:

- 4 μ l Cl_2Mg 25 mM.
- 2 μ l Reverse transcription buffer x 10 (100 mM Tris-ClH pH 8.8, 500 mM ClK, 1% Tritón X-100).
- 2 μ l dNTPs 10 mM.
- 0.5 μ l de inhibidor de RNasa (RNasin).
- 30 unidades AMV reverse transcriptasa (H.C.).
- 1 μ g de oligo(dT)₁₅ primer.
- 2 μ g de ARN total.
- Agua libre de RNasa hasta un volumen de 20 μ l.

La reacción se incubó a 42°C durante 15 minutos. Posteriormente se mantuvo a 95°C durante 5 minutos y se incubó en hielo durante otros 5 minutos. Finalmente a los 20 μ l de reacción se le añadieron 80 μ l de agua destilada y los 100 μ l resultantes se congelaron a -20°C hasta que se utilizó para ensayos de PCR.

8.3.AMPLIFICACION ESPECIFICA DEL ADNc MAGE-1.

8.3.1.MATERIAL.

- 5 μ l de ADNc total.

- Oligonucleotidos específicos:

CHO14 5'-CGGCCGAAGGAACCTGACCCAG-3'

CHO12 5'-GCTGGAACCCTCACTGGGTTGCC-3'

(secuencias cedidas por el Instituto Ludwig para la Investigación del Cáncer-Bruselas-).

8.3.2.REACCION/CONDICIONES DE PCR.

La reacción de PCR se realizó en un volumen de 50 μ l, utilizándose 5 μ l de ADNc total y las concentraciones de buffer, dNTPs, primers y Taq polimerasa indicadas en el apartado 1.1.2.

La PCR se realizó en un termociclador *Perkin Elmer Ceturs Instruments*:
(94°C 5 minutos) x 1 ciclo, (94°C 1 minuto, 72°C 3 minutos) x 30(35) ciclos,
(72°C 10 minutos) x 1 ciclo.

20 μ l del volumen final fueron chequeados en gel de agarosa 3%. El tamaño del amplificado fue de 421 pb.

8.4.AMPLIFICACION DE OTROS ADNcs.

8.4.1.AMPLIFICACION DE β -ACTINA.

Como control positivo para la técnica de transcripción inversa se utilizó la amplificación del ADNc de la β -actina que teóricamente tenía una expresión similar en todas las líneas celulares utilizadas.

8.4.1.1.MATERIAL.

- 5 μ l de ADNc total.
- Oligonucleótidos específicos:

AC-FW 5'-TACCTCATGAAGATCCTCACCGAGGCG-3'

AC-BW 5'-TTTCGTGGATGCCACAGGACTCCATG-3'

8.4.1.2.CONDICIONES DE PCR.

Se utilizaron las mismas condiciones que para la amplificación del ADNc MAGE-1. El tamaño del amplificado fue de 267 pb.

8.4.2.AMPLIFICACION DE BCR/ABL.

Esta determinación se utilizó para la identificación de las líneas K562A y B.

8.4.2.1.MATERIAL.

- 5 μ l de ADNc total.

- Oligonucleótidos específicos:

BCRex-S 5'- TTCAGAAGCTTCTCCCTG-3'

ABLex-AS 5'- CTCCACTGGCCACAAAAT-3'

8.4.2.2.CONDICIONES DE PCR.

La reacción de la PCR se realizó en la forma ya comentada, y las condiciones fueron las siguientes: (94°C 5 minutos) x 1 ciclo, (94°C 1 minuto, 52°C 1 minuto, 72°C 2 minutos) x 30 ciclos, (72°C 10 minutos) x 1 ciclo.

El tamaño del amplificado fue de 327 pb.

9.DETERMINACION DEL INMUNFENTOTIPO DE LA LINEA K562.

9.1.MATERIAL.

- AcMo fluoresceinados (CD15, CD71, CD61, CD45, Control negativo).
- AcMo ficoeritrina (CD13, CD33, GL-A, CD11b, Control negativo).

(los AcMo fueron suministrados por *Becton- Dickinson*, excepto la GL-A que fue suministrada por *Immunotech*).

- Citómetro de flujo FACSort Becton-Dickinson

9.2.METODO.

1. Se utilizaron aproximadamente 10.000 células por determinación que se encontraban en fase exponencial de crecimiento, excepto aquellas que había sido previamente tratadas, que fueron recogidas 72 hrs. después del tratamiento.
2. Las células fueron lavadas dos veces en tampón fosfato, antes de ponerlas en contacto con el AcMo.
3. La mezcla se incubó durante 30 min. a 4°C. Posteriormente la células fueron nuevamente lavadas dos veces en tampón fosfato.
4. El inmunofenotipo se determinó mediante citometría de flujo, obteniéndose histogramas de fluorescencia que se ajustaron a valores basales.

**10.MEDIDA DE LA ACTIVIDAD PROLIFERATIVA DE LA LINEA K562
POR INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA.**

10.1.MATERIAL.

- Timidina tritiada (T-H³, 1 mCi/ml)(*Amershan*).
- Contador Microbeta 1450 (*Wallac*).

10.2.METODO.

1. Se utilizaron aproximadamente 1 millón de células en fase exponencial de crecimiento, excepto para las células tratadas con Ara-C, que fueron ensayadas 72 hrs. después del tratamiento.
2. las células se lavaron dos veces en tampón fosfato y se distribuyeron en 4 pocillos de placa, en un volumen de 5 ml de medio RPMI.
3. Se añadió por pocillo 0.1 μ Ci/ml de timidina tritiada.
4. El conteo radioactivo se realizó a las 20 hrs. aproximadamente en un contador beta.

11. ENSAYOS REALIZADOS CON EL ADN DE LAS DIFERENTES LINEAS.

Además del ADN de las diferentes líneas, también se utilizó ADN de muestras de leucocitos y de espermatozoides procedente del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Virgen de las Nieves (GRANADA).

11.1. EXTRACCION DE ADN.

11.1.1. MATERIAL.

- Tampón de lisis (Tris-ClH 10 mM pH 7.6, EDTA 10 mM pH 8, ClNa 50 mM).
- SDS 10%.
- Proteinasa K (20 mg/ml).
- Fenol.
- Cloroformo:Alcohol isoamílico 24:1 (Sevag).

11.1.2. METODO.

1. Se partió de 10^5 a 10^6 células. Al botón de células, después de ser centrifugado y lavado con tampón fosfato, se le añadieron 3 ml de tampón lisis y se mezcló. Posteriormente se añadió 100 μ l de SDS 10% y proteinasa K hasta una concentración de 100 μ g/ml y se incubó toda la noche en un baño a 42°C.

2. La solución acuosa, en donde se encontraba el ADN, se extrajo dos veces con igual volumen de fenol:sevag (3:1) y otras dos veces con sevag.

3. Tras la extracción el ADN, fue precipitado añadiendo ClNa 3 M 1/10 y 3 volúmenes de etanol, la mezcla se agitó suavemente hasta la aparición de la madeja de ADN.

4. La madeja se recogió con un pipeta pasteur y se lavó dos veces con etanol al 70%, para finalmente secarla ligeramente y resuspenderla en agua destilada (0.5-1 ml).

5. Cuando el ADN estaba bien disuelto (1-2 días a 4°C) se midió la concentración a 260 nm.

11.2.ENSAYO DE SOUTHERN BLOT.

11.2.1.OBTENCION DE LA SONDA CORRESPONDIENTE AL PROMOTOR DE MAGE-1.

La sonda se encontraba clonada en el plásmido pTZ1.900. Este plásmido fue cedido por el Dr. Charles De Smet del Instituto Ludwig de Buselas. La sonda fue liberada digiriendo el plásmido con las enzimas EcoR1 y HindIII, con un tamaño de 0.9 kb. La liberación y purificación se llevó a cabo como ya se ha descrito en apartados anteriores para cualquier inserto clonado en un plásmido. Resumiendo, el protocolo consiste en: digerir 5 μ g del plásmido pTZ1.900 con las enzimas

EcoRI/HindIII en un volumen de 30 μ l, acto seguido el inserto es separado del vector en gel de agarosa 1% y purificado con el Kit GENE CLEAN.

11.2.2.MARCAJE RADIOACTIVO DE LA SONDA (RANDOM PRIMER).

11.2.2.1.MATERIAL.

- 50 ng de sonda.
- 5 μ l de 32 P-dCTP (*Amersham*).
- Kit Megaprimer (*Stratagene*) que contiene: Primers, buffer de reacción y enzima Klenow.

11.2.2.2.METODO.

La reacción de marcaje se realizó en un volumen de 50 μ l.

1. Primeramente la sonda fue desnaturalizada, se añadió 50 ng de sonda, 5 μ l de primers, agua destilada hasta un volumen de 28 μ l y se calentó a 95°C durante 5 minutos, posteriormente se dejó enfriar lentamente.

2. Una vez enfriada la muestra se le adicionó 10 μ l de buffer de reacción, 5 μ l de 32 P-dCTP y 1 μ l de enzima Klenow. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 1 hora.

3. La sonda fue purificada en columna de exclusión que contenía Sephadex G25.

11.2.3.DIGESTION DEL ADN.

11.2.3.1.MATERIAL.

- 20 μg de ADN de las diferentes líneas.
- Enzimas de restricción MspI y HpaII (*Boehringer*).
- Buffer de digestión L x 10 (*Boehringer*).

11.2.3.2.METODO.

La digestión se llevó a cabo en un volumen de 80 μl . La misma muestra fue digerida de forma independiente con una y otra enzima. La reacción contenía además del ADN, 10 u de enzima/ μg de ADN y 8 μl de buffer L x 10. El ADN fue digerido durante 12 horas a 37°C.

11.2.4.TRANSFERENCIA DE LOS FRAGMENTOS DE ADN A FILTRO DE NYLON (TRANSFERENCIA ALCALINA).

11.2.4.1.MATERIAL.

- SSC x 20 (ClNa 3M Citrato sódico 0.3 M pH 7.0).
- Solución de NaOH 0.4 N y ClNa 0.6 M.
- solución Tris-ClH 0.2 M pH 7.5, SSC x 2.
- Membrana de Nylon (*Hoefler*).

- Papel 3 MM.

11.2.4.2.METODO.

1. Previo a la transferencia, las muestras de ADN digeridas fueron separadas en sus diferentes fragmentos en gel de agarosa al 1%. Antes de la transferencia, el gel se lavó durante 30 minutos en agitación en la propia solución de transferencia (NaOH 0.4 N/CINa 0.6 M).

2. La transferencia se realizó por capilaridad sobre una membrana de nylon de idénticas dimensiones al gel. El gel se puso sobre papel de filtro 3 MM humedecido en la solución de transferencia y que, sobre un soporte, comunicaba dos recipientes que contenían dicha solución.

3. Sobre el gel se puso la membrana de nylon humedecida en solución de transferencia y justo encima 5 trozos de papel 3 MM de igual tamaño e igualmente humedecidos. Sobre el conjunto se puso un bloque de papel secante (10 cm.), siempre con las mismas dimensiones del gel, y sobre éste un peso uniforme de 500 grs. aproximadamente.

4. La transferencia se dejó durante aproximadamente 18 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo el filtro estaba listo para la hibridación.

11.2.5.HIBRIDACION DEL FILTRO CON LA SONDA MARCADA.

11.2.5.1.MATERIAL.

- Sonda marcada.
- SSC x 20.
- PO_4Na_3 1M pH 6,8.
- Solución Denhard x 10.
- Formamida pH 7.0.
- SDS x 10.
- Esperma de salmón 100 mg/ml.

11.2.5.2.METODO.

Prehibridación.

La solución de prehibridación contenía: formamida 50%, SSC x 4, PO_4Na_3 20 mM pH 6,8, Denhard x 1, SDS 0.2% y esperma de salmón 10 mg.

La solución de prehibridación fue calentada a 42°C, vertida sobre el filtro e incubada durante 2 horas.

Hibridación.

Se utilizó la misma solución que en la prehibridación, a la cual se le añadió la sonda desnaturalizada.

1. La desnaturalización se llevó a cabo calentando la sonda a 100°C durante

10 minutos y enfriando rápidamente en hielo durante 5 minutos. Se utilizaron 2 x 10⁶ c.p.m./ml de solución de hibridación.

2. La sonda no se añadió directamente sobre el filtro, sino que se diluyó en solución de prehibridación y acto seguido fue vertida sobre el recipiente que contenía el filtro con el resto de la solución de hibridación.

3. La hibridación se llevó a cabo a 42°C durante 24 horas.

4. Transcurrido este tiempo el filtro se lavó para quitar el exceso de sonda que no había hibridado. Primeramente el filtro se lavó cuatro veces durante 5 min. a temperatura ambiente con una solución de SSC x 2 y SDS 0.1 %, seguidamente se realizó un segundo lavado durante 30 minutos a 55°C con una solución de SSC x 0.1 y SDS 0.1 %.

5. Finalmente el filtro se secó ligeramente y se expuso en una placa de rayos X a -80°C durante un tiempo que variaba dependiendo de la radiactividad fijada.

11.3.DETERMINACION DE METILACION PUNTUAL EN EL PROMOTOR DE MAGE-1.

Esta técnica ha sido puesta a punto en nuestro laboratorio y permitió, mediante la conjugación de la digestión enzimática y la técnica de PCR, determinar la metilación o no de ciertos puntos claves en el promotor del gen MAGE-1.

11.3.1.MATERIAL.

- ADN de las diferentes muestras.
- Enzimas de restricción MspI y HpaII.
- Buffer de digestión L.
- Oligos específicos:

CDS20 5'-GTTCCCGCCAGGAAACAT-3'

CDS22 5'-AGAAGCGAGGTTTCCATT-3'

EDP4 5'-GGGGCTCTCTATTTGGAG-3'

(Secuencias cedidas por el instituto Ludwig para la investigación del
Cáncer-Bruselas-).

11.3.2.METODO.

1. La primera etapa consistió en una digestión enzimática. 100 ng de ADN de las diferentes líneas fueron digeridos de forma independiente por las enzimas MspI y HpaII.

2. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 25 μ l, se utilizaron 40 u de las diferentes enzimas y la digestión se llevó a cabo a 37°C durante 12 horas. De forma paralela se realizó un ensayo control, en el cual la misma cantidad de ADN era sometida a idéntico protocolo, excluyendo la enzima de restricción.

3. En una segunda etapa el ADN digerido y control fueron sometidos a PCR:
3 μ l de la reacción (12 ng de ADN) fueron sometidos a PCR en un volumen de 50

μ l. La cantidad de los tres oligonucleótidos era de exactamente 70 ng cada uno, siendo el resto de la reacción idéntica a la utilizada en ensayos anteriores. Las condiciones de la PCR fueron: (94°C 5 minutos) x 1 ciclo, (94°C 1 minuto, 55°C 30 segundos, 72°C 1 minuto) x 40 ciclos, (72°C 10 minutos) x 1 ciclo.

3. La tercera etapa consistió en chequear 15 μ l de la reacción en gel de agarosa al 3%.

11.4.TIPIFICACION GENOMICA DE LAS LINEAS K562A Y K562B.

La tipificación genómica se realizó mediante dot-blott reverso. Para este ensayo se utilizó el kit AMPLICOR™ HLA DRB TEST (ROCHE). Con el tipaje genómico se pretendió demostrar la identidad en origen de ambas líneas, para ello el tipaje quedó restringido a la cadena β (DRB1) de la molécula HLA-DR. Concretamente la secuencia analizada estaba localizada en el segundo exón polimórfico de los genes DRB1 y DRB5.

11.4.1.MATERIAL.

. Amplicor HLA DRB Typing kit:

- HLA DRB MASTER MIX (solución de Tris-ClH que contiene 10% glicerol, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, primers biotinilados AmpErase™, AmpliTaq® y 0.05% azida sódica).

- 1.5 mM Cl_2Mg .

. **Amplicor Strip Detection Reagent kit:**

- Solución de desnaturalización (solución de EDTA con 1,6% OHNa y tymol blue).
- 20x SSPE (solución de fosfato sódico con ClNa, EDTA y 1 % de Proclin 150TM).
- 20% SDS con 1 % de Proclin 150TM.
- Conjugado de STREPTAVIDIN-HRP (Streptavidin-horseradish conjugada con peroxidasa en una solución de ACES con ClNa y 1 % de Proclin 150TM como preservativo).
- Sustrato A (solución de citrato con 0.01 % de H₂O₂ y 0.1 % de Proclin 150TM como preservativo).
- Sustrato B (0,1 % 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidina -TMB- en 40% de dimethylformamida -DMF-).
- 10x Citrato sódico.

. **Amplicor Typing Trays.**

11.4.2.METODO.

1. Realización de la PCR, para la cual se utilizaron 500 ng de ADN de las diferentes líneas. La reacción de la PCR se realizó en un volumen de 100 μ l, según indicaciones del kit Amplicor HLA DRB y el programa utilizado fue: (50°C 2 min.) x1 ciclo, (95°C 15 seg., 60°C 45 seg., 72°C 15 seg.) x 35 ciclos, (72°C

5 min.) x1. El resultado de la amplificación fue un fragmento de un tamaño de 272 pb.

2. Las tiras de nylon, que contenían adheridos los oligonucleótidos específicos de alelo, fueron incubadas con tampón de hibridación (4x SSPE, 0.5% SDS) precalentado a 50°C mas 70 μ l de amplificado previamente desnaturalizado (72°C 5 min.). La incubación se realizó a 50°C en un baño rotatorio durante 30 min.

3. Las muestras fueron lavadas con tampón de lavado (1x SSPE, 0.1% SDS), previa retirada de la solución de hibridación, a temperatura ambiente durante algunos segundos. El lavado se repitió durante 15 min. en baño rotatorio a 50°C, añadiendo el tampón precalentado a la misma temperatura.

4. La solución de lavado fue retirada de las muestras y se añadió 3 ml de solución conjugada por muestra (3.3 ml de solución de lavado a t^a ambiente más 10 μ l de conjugado de Streptavidine-HRP por muestra). La incubación se realizó a temperatura ambiente en agitador y durante 20 min.

5. Las muestras fueron nuevamente lavadas, primero durante unos segundos y posteriormente durante 5 min. en agitación a temperatura ambiente.

6. Previo al revelado, las muestras fueron tratadas con solución de citrato 0.5x durante 5 min. a temperatura ambiente.

7. La solución de sustrato fue preparada mezclando sustrato A y sustrato B en una proporción 4:1. El revelado se realizó en obscuridad durante 20 min. a temperatura ambiente. Pasado este tiempo la solución de revelado fue retirada y se añadió agua destilada en dos pasos de 5 min. cada uno para parar la reacción.

8. Finalmente se añadió solución citrato 0.5x y se procedió a la lectura e interpretación de los resultados.

12. ENSAYO DE MOVILIDAD EN GELES DE RETARDO.

12.1. PREPARACION DE EXTRACTOS NUCLEARES.

Las líneas tumorales que se utilizaron para este ensayo fueron K562, HL60 y COLO668.

12.1.1. MATERIAL.

- Tampón A (10 mM Hepes pH 7.6, 10 mM ClK, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 0.75 mM Spermidina, 0.15 mM Spermina). Antes de usar se complementa con: 1 mM DTT, 1x Inhibidores de proteasas, 0.5 mM PMSF, 10 mM MoO_4Na_2 y 1x Pestatín.
- Tampón C (20 mM Hepes pH 7.6, 0.4 M ClNa, 1 mM EDTA y 1 mM EGTA). Antes de usar se complementa con: 1 mM DTT, 2x Inhibidores de proteasas, 0.5 mM PMSF, 10 mM MoO_4Na_2 y 2x Pestatín.

12.1.2. METODO.

1. Se tomaron entre 5 y 10 x10⁶ células, se lavaron dos veces con tampón fosfato y se transfirieron a un tubo eppendorf.
2. Las células se resuspendieron suavemente con 200 μl de tampón A frío, se añadió el mismo volumen de tampón y se mantuvieron en hielo durante 15 min.

-B'm 3'-CGGGCACCCcGGATGTTTCC-5'
 5'-GCCCGTGGGcCTACAAAGG-3'
 ("c" incorporación de 5-metilcitosina)

El marcaje de la sonda se realizó con (γ - ^{32}P)dCTP por reacción de relleno, utilizando la enzima Klenow, éste fue el caso de Oct-1 y B'. Se utilizó el kit Megaprimer (*Stratagene*), del cual se utilizó el buffer de reacción y la enzima Klenow.

En el caso de la sonda B'm se marcó con 0.1 mCi de (α - ^{32}P)dATP utilizando la T4 polinucleótido kinasa (*Amersham*) en 50 μl de tampón kinasa (60 mM Tris-CIH
ph 8.5, 20 mM Cl_2Mg , 20 mM DTT). La reacción se incubó durante 30 min. a 37°C.

Las sondas fueron purificadas por cromatografía de exclusión.

12.3.REACCION/ENSAYO DE MOVILIDAD.

12.3.1.MATERIAL.

- Extractos nucleares.
- Tampón C.

- Tampón Sharp 5x (50 mM ClK, 2.75 mM EDTA, 17.5% glicerol y 60 mM Hepes pH 7.6).
- Poli(dI-dC).poli(dI-dC) (1mg/ml).
- Oligonucleótido de doble cadena.
- Acrilamida:bisacrilamida (29:1).
- TBE 10x.

12.3.2.METODO.

1. 10 μ g de extracto nuclear fueron diluidos en 10 μ l de tampón C e incubado durante 5 min. a temperatura ambiente con 4 μ l de tampón Sharp 5x, 2 μ l de Poli(dI-dC).poli(dI-dC) y 3 μ l de oligonucleótido competidor (0.3 pmoles/ μ l).
2. Después de esta incubación se añadieron $3 \cdot 10^4$ cpm de la sonda y la incubación se continuó durante 25 min. a la misma temperatura.
3. Las muestras fueron finalmente cargadas en un gel de poliacrilamida al 8%, que había sido previamente precorrido durante 2hrs. a 20mA. El tampón utilizado, tanto para la confección del gel, como para la electroforesis fue TBE 1x.
4. El gel fue posteriormente secado en un secador de geles de vacío a 80°C durante 2 hrs. y autorradiografiado a -80°C durante 48 hrs.

13. ENSAYO FUNCIONAL DEL PROMOTOR DE MAGE-1 (REGION B'B).

El ensayo funcional consistió en medir la actividad transcripcional de la región promotora B'B del gen Mage-1 acoplada al gen de la luciferasa (clonado en estado funcional en el plásmido pXP1). La síntesis de la enzima luciferasa quedaba, de esta forma, controlada por la región promotora del gen Mage-1 y la medición de la actividad luciferasa se podía correlacionar con la actividad transcripcional de la región promotora B'B.

13.1. CONSTRUCCION DEL PLASMIDO pMAGE-1luc80.

13.1.1. OBTENCION DE LA REGION PROMOTORA B'B.

13.1.1.1. MATERIAL.

- Plásmido pTZ1.900 (De Smet y col. 1995).
- Primer CDS20.
- Primer 1427 **5'-CAAGGAAACAGCTATGACCATG-3'**
(secuencia cedida por el I.L. para la Investigación del
Cáncer).
- Enzimas de restricción Sal 1 (*Amersham*).
- Buffer One for All Plus (*Amersham*).

13.1.1.2.METODO.

El fragmento correspondiente a la región promotora B'B se obtuvo mediante PCR, partiendo del plásmido pTZ1.900 que contenía el promotor completo (0.9 kb). Para la reacción de PCR se utilizaron los primers CDS20 (sentido) y 1427 (antisentido) y cuya secuencia complementaba con otra que formaba parte del plásmido anteriormente nombrado. Las condiciones de PCR y de reacción fueron las señaladas en los apartados 1.1.2 y 9.3.2.

El amplificado fue chequeado y purificado por CLEAN UP (apartado 1.1.4), y posteriormente fue sometido a digestión enzimática con la enzima Sal 1 en buffer One for All Plus durante 1 hora a 37°C.

El fragmento digerido fue purificado mediante el sistema GENE CLEAN (apartado 1.1.6.3).

13.1.2.LIGACION DEL INSERTO (REGION B'B) AL VECTOR pXP1.

La ligación se realizó en las mismas condiciones descritas anteriormente (apartado 1.2), previamente el vector pXP1 había sido digerido con las enzimas Sal I/Sma I (*Amersham*).

13.2. CLONAGE Y OBTENCION DE GRAN CANTIDAD DEL PLASMIDO

pMAGE1-luc80.

La transformación bacteriana, selección de clones, chequeos de los diferentes clones y obtención a gran escala de plásmido, se realizaron en las mismas condiciones ya descritas anteriormente (apartados 1.3/1.4.2/5.2).

Otros plásmidos que se utilizaron en el ensayo fueron:

- pXP1.
- pSV2luc (que contiene el promotor del virus SV40 en 5' del gen de la luciferasa) (cedido por el Dr. De Smet, Instituto Ludwin Bruselas).
- pSV- β -galactosidasa (que contiene el promotor del virus SV40 en 5' del gen de la β -galactosidasa) (*Promega, Madison WI*).

13.3. ENSAYOS FUNCIONALES.

13.3.1. ENSAYOS DE TRANSFECCION TRANSITORIA.

13.3.1.1. MATERIAL.

- Líneas celulares utilizadas: K562, HL60, MZ2-MEL 3.0, LB23, LB37 y COLO668.

- Plásmidos pXP1, pMAGE1-luc80, pSV2-luc y pSV- β -galactosidasa.
- Electroporador BTX 600.

13.3.1.2.METODO.

1. Se utilizaron aproximadamente 10^6 células por ensayo de transfección. Las células fueron cultivadas en las condiciones descritas en el apartado 6.
2. Las células fueron lavadas dos veces en medio RPMI 1640 frío.
3. El ensayo de transfección se realizó en un volumen de 0.5 ml del mismo medio en cubetas de 2 mm.
4. En cada línea ensayada se utilizaron tres transfecciones independientes: transfección de pXP1 como control, cotransfección pMAGE-1luc80/pSV- β -galactosidasa y cotransfección pSV2-luc/pSV- β -galactosidasa. De cada plásmido se utilizaron 50 μ g.
5. Las condiciones de electroporación fueron las siguientes:
K562 (400 V, 600 μ F, 13 ohm), HL60 (350 V, 100 μ F, 13 ohm), MZ2-MEL 3.0 (120 V, 300 μ F, 24 ohm), LB23 (130 V, 600 μ F, 13 ohm), LB37 y COLO668 (200 V, 25 μ F, 13 ohm).
6. Finalmente las células fueron puestas en 10 ml de medio de cultivo completo, y cultivadas durante 14 horas.

13.3.2.MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LUCIFERASA/

β -GALACTOSIDASA.

13.3.2.1.MATERIAL.

- Tampón de lisis (0.25 M Tris-ClH pH 8.0).
- Sistema de ensayo de luciferasa (*Promega*).
- Tampón de ensayo de β -galactosidasa (*Promega*).
- Luminómetro Lumat LB 9501 (*Berthold*).

13.3.2.2.METODO.

1. El total de las células transfectadas fueron lavadas dos veces con tampón fosfato PBS.
2. El pellet de células fue resuspendido en 200 μ l de tampón de lisis y sometidas a cuatro períodos de congelación(-80°C)/descongelación(37°C).
3. El lisado de células fue centrifugado a 13000 rpm durante 5 min. Del sobrenadante, 20 μ l se utilizaron para el ensayo de luciferasa y 100 μ l para el ensayo de β -galactosidasa.
4. La actividad luciferasa se midió en un luminómetro mezclando 20 μ l de lisado celular y 100 μ l de sustrato luciferina (preparado según protocolo). La actividad luciferasa se midió durante 20 seg.

5. La actividad β -galactosidasa se midió en espectrofotómetro a 420 nm de longitud de onda. Para esta determinación se mezcló 100 μ l de lisado celular, 100 μ l de tampón de ensayo 2x y se incubó a 37°C durante un tiempo variable, hasta que la mezcla adquiría una coloración amarillenta.

RESULTADOS

ESTUDIO DE LA PROTEINA RECOMBINANTE MAGE-1 EN SISTEMA PROCARIOTA.

1. CLONACION DEL GEN MAGE-1 EN VECTOR DE EXPRESION.

El gen Mage-1 se extiende sobre aproximadamente 4,5 kb y consta de tres exones de 65, 73 y 1553 pb respectivamente. La fase abierta de lectura está localizada íntegramente en el exón tres, encontrándose el codón iniciador, ATG, en posición 3088 y el codón stop, en este caso TGA, en posición 4015 (Van der Brugen y col. 1991).

La clonación de la fase abierta de lectura completa se realizó en un vector de expresión denominado pGEX-2T, que tiene como característica fundamental el poseer el gen de la glutatión-S-transferasa en posición 5' del sitio de clonación múltiple.

El inserto se obtuvo mediante PCR, utilizando ADN de linfocitos y unos oligonucleótidos que portaban en su extremo 5' una secuencia no complementaria que era diana para una enzima de restricción concreta. El oligonucleótido "Sense", MAGEFW, portaba un punto de corte para BamHI, mientras que el primer "Antisense", EGAMRW, lo portaba para EcoRI; de esta forma se consiguió clonar el fragmento en la orientación adecuada y con la fase de lectura correcta (**fig. 1**).

El gen Mage-1 pertenece a una familia de por lo menos 12 genes, con los

que muestra un porcentaje de identidad en su último exón que varía entre el 64% y el 85% (De Plaen y col. 1994), lo que hizo necesario el asegurarse de que el inserto clonado correspondía a Mage-1 y no a algún otro miembro de la familia. Aunque se hicieron análisis de la construcción mediante PCR, utilizando primers internos específicos (**fig. 2**), fue el análisis mediante secuenciación el que confirmó la identidad del inserto como MAGE-1 (**fig. 3**).

2. PRODUCCION DE LA PROTEINA RECOMBINANTE.

Dadas las características del vector de expresión, la proteína recombinante resultante fue una proteína híbrida, constituida en su mitad 5' por la Glutathion-S-transferasa y en su mitad 3' por la proteína MAGE-1. Ambas proteínas estaban unidas por una secuencia de aminoácidos, diana de la enzima trombina, que permitía su separación mediante digestión enzimática.

La cepa de la bacteria *E. coli* XL1-blue fue transformada con la construcción plasmídica y sometida a protocolo de inducción de la proteína recombinante. El gen clonado se encontraba bajo el control del promotor del operón de la Lactosa, por lo que se utilizó como inductor el IPTG (0,1mM).

En unos ensayos preliminares y mediante el análisis de extractos bacterianos inducidos y no inducidos, en electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida, se pudo observar la banda recombinante específica de un tamaño esperado de

aproximadamente 63 kD (**fig. 4**).

La proteína recombinante producida en grandes cantidades fue purificada del resto del extracto bacteriano en columna de afinidad, y el resultado fue analizado en gel de poliacrilamida, que mostraba la presencia de varias bandas que se distribuían por encima y debajo de la proteína inducida. La explicación a este resultado era la posible degradación de la proteína en el protoplasma bacteriano, aún cuando se trataba de una proteína híbrida GST-Mage-1 y de que la GST se producía intacta en las mismas condiciones; en cuanto a las bandas de mayor peso molecular, podían tratarse de proteínas bacterianas fijadas de forma inespecífica por la columna o bien de agregados proteicos formados por la proteína recombinante. Parece que ésta última hipótesis es la más plausible, ya que anticuerpos producidos frente a un péptido sintético Mage-1 eran capaces de reconocer estos agregados (Yao-Tseng Chen y col. 1994). Otras razas bacterianas fueron utilizadas: DH1, Y1089 y SureTM, con idénticos resultados (**fig. 4**).

Para obtener la mayor parte de la proteína recombinante intacta se cambiaron las condiciones del cultivo bacteriano: Se sustituyó el cultivo de larga duración por un cultivo de corta duración, y la menor masa bacteriana/volumen de medio de cultivo fue suplida por un aumento del volumen absoluto de medio de cultivo. El resultado fue el esperado, ya que se impidió que el cultivo bacteriano superara la fase exponencial de crecimiento, y por tanto que la proteína recombinante extraña se acumulara en el protoplasma y fuera completamente degradada (**fig. 5**).

La proteína Mage-1 fue separada de la proteína GST mediante digestión enzimática con trombina. Un análisis en gel de poliacrilamida mostró la proteína Mage-1 con un tamaño aproximado de 34 kD (**fig. 5**), sin embargo su purificación en columna de afinidad resultó infructuosa.

ANALISIS DE LOS SUEROS OBTENIDOS FRENTE A LA PROTEINA RECOMBINANTE MAGE-1.

Varios sueros policlonales fueron obtenidos frente a la proteína híbrida. El origen de estos sueros fue diferente, se utilizaron ratones de la raza Balb/c y aves (Gallus domesticus). Los sueros fueron preabsorbidos con extractos bacterianos, con el fin de limpiarlos de inmunoglobulinas no específicas, y en el caso de los sueros de ave se realizó una purificación en columna inmunoabsorbente, utilizando la proteína recombinante como tal (**fig. 6**).

1. ANALISIS MEDIANTE WESTERN-BLOT.

Ambos sueros mostraban su reactividad frente a la proteína recombinante, curiosamente esta reactividad estaba dirigida hacia la proteína MAGE-1, siendo mínima la mostrada por la proteína de fusión GST (**fig. 7**).

Cuando los sueros se ensayaron con extractos celulares positivos para la expresión del antígeno MAGE-1, no reconocieron la proteína nativa en estado desnaturalizado. Esto indicaba que la proteína podría encontrarse en muy baja concentración en la célula ensayada, o que su estado, incluso en condiciones desnaturalizantes, ocultase los epítomos reconocidos por el antisuero.

2. ANALISIS MEDIANTE INMUNOPRECIPITACION.

Los sueros fueron incapaces de inmunoprecipitar la proteína MAGE-1 en extractos celulares sometidos a marcaje metabólico de sus proteínas.

En este caso se utilizaron condiciones no desnaturalizantes, lo que hace suponer que los epítomos presentes en la proteína nativa podían variar bastante de los presentes en la proteína recombinante, que fue la que se utilizó en la inmunización y frente a la cual se generó el antisuero.

3. ANALISIS MEDIANTE INMUNOHISTOQUIMICA.

Los antisueros se ensayaron con cortes histológicos criopreservados y parafinados de diferentes tejidos tumorales y no tumorales. Los primeros ensayos mostraron una reactividad clara de los antisueros de pollo con ciertos tumores, al igual que con tejido testicular, mostrando una reactividad más difusa con otros

tejidos (**tabla 1**)(**fig. 8**).

Se podía hacer, en este sentido, un paralelismo entre los resultados obtenidos con el análisis inmunohistoquímico y los resultados publicados sobre la expresión de MAGE-1 en tumores de origen histológico diferente y tejido normal (Van der Bruggen y col. 1991). Además nuestros resultados aportaban la heterogeneidad de expresión en la masa tumoral, que no podía ser detectada mediante la técnica de RT-PCR (**fig. 9**).

Sin embargo la reactividad del antisuero no se hizo extensible a algunas líneas tumorales, las cuales se sabía que expresaban el antígeno. No sabemos cuales podían ser estas causas, aunque podían estar relacionadas con el tratamiento previo de las células.

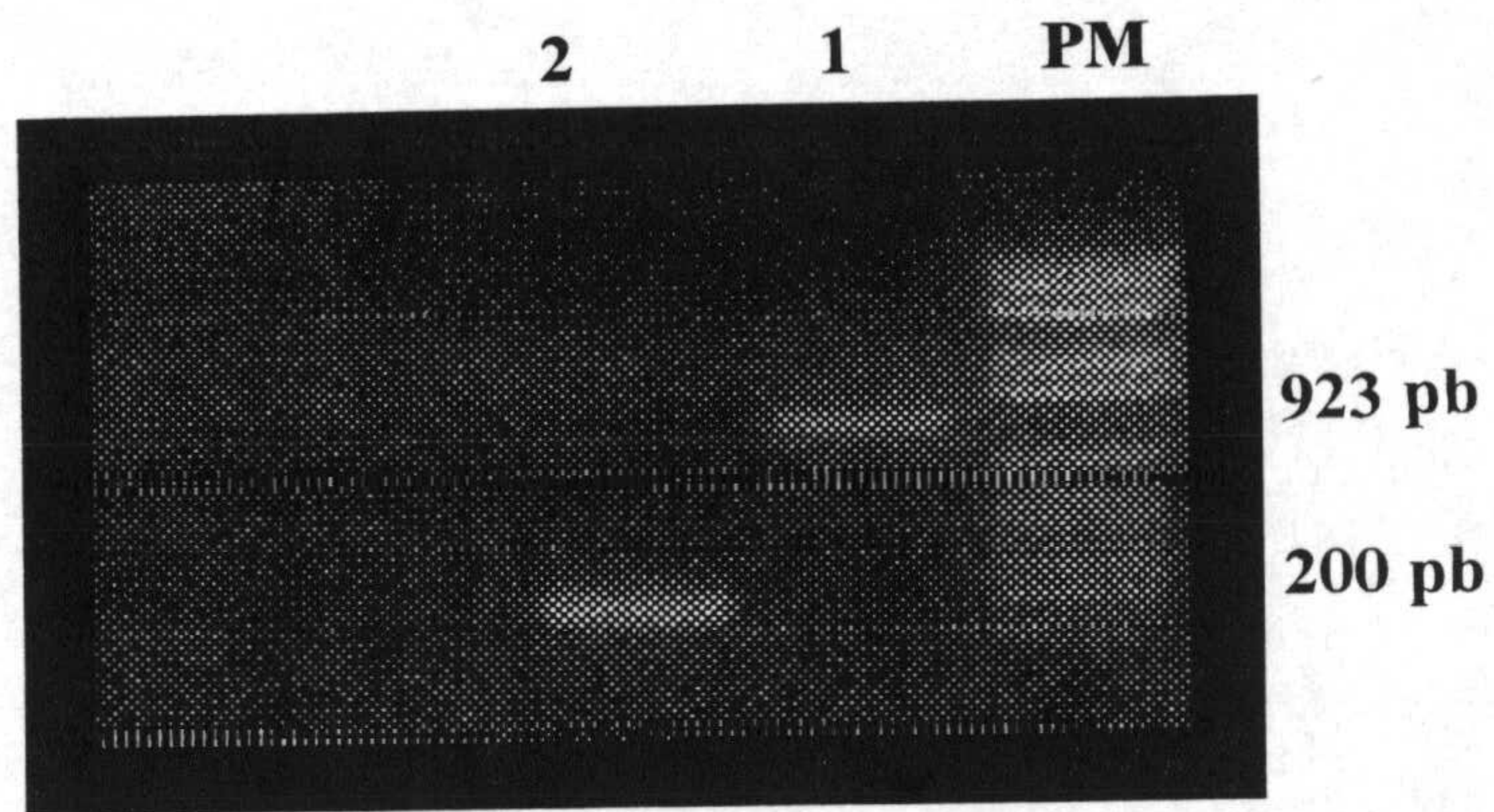


Fig.2. Resultado de la PCR realizada con los primers de clonación (1) y con los primers CHO12/CHO4 (2), específicos del gen Mage-1, sobre el plásmido pGEX-2T-INSERTO. Los resultados indican que el inserto equivale a MAGE-1.

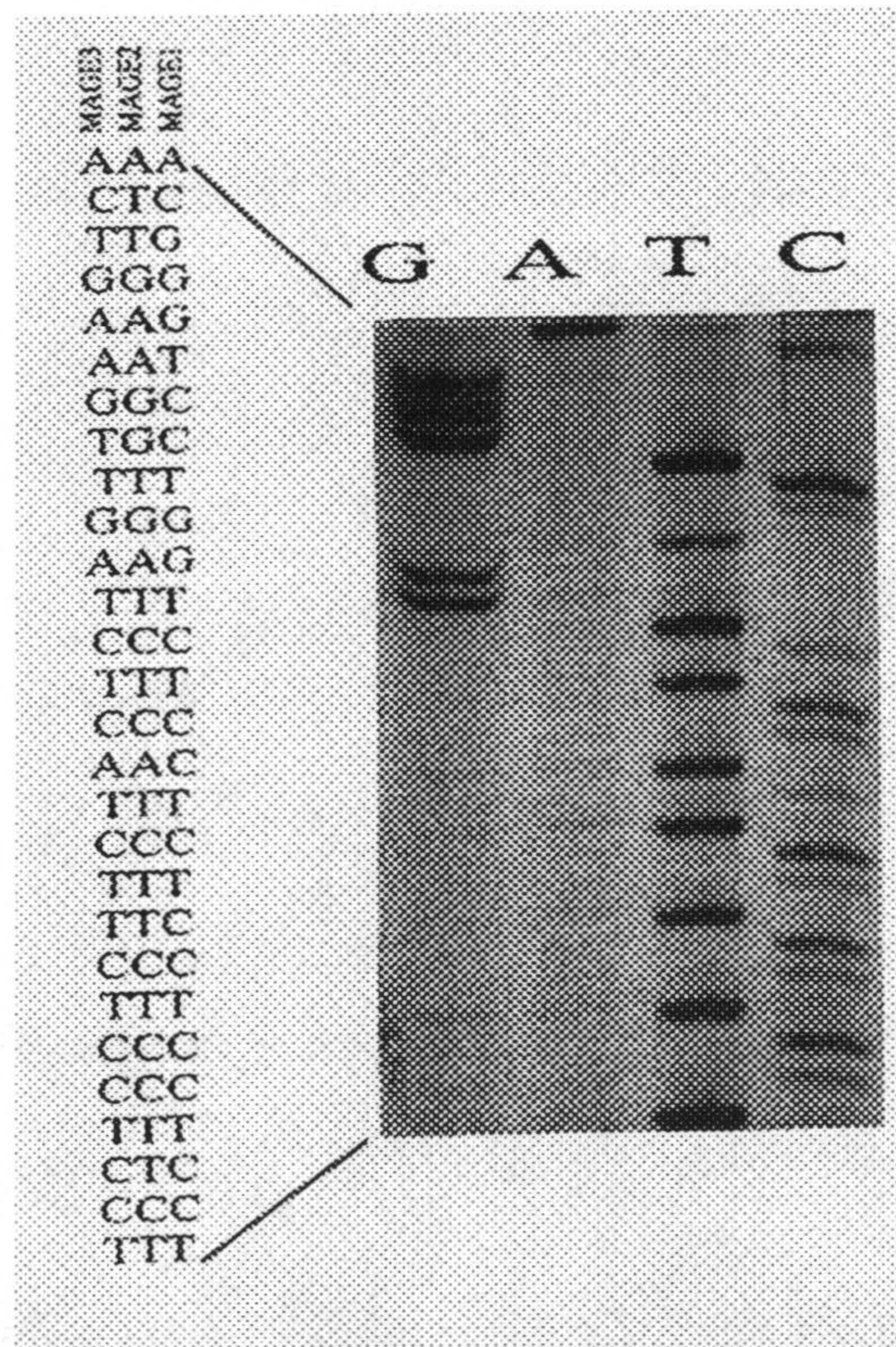


Fig.3. Constatación, mediante secuenciación, del inserto como MAGE-1. La figura muestra el detalle de un fragmento polimórfico del gen Mage-1, respecto de los genes Mage-2 y Mage-3.

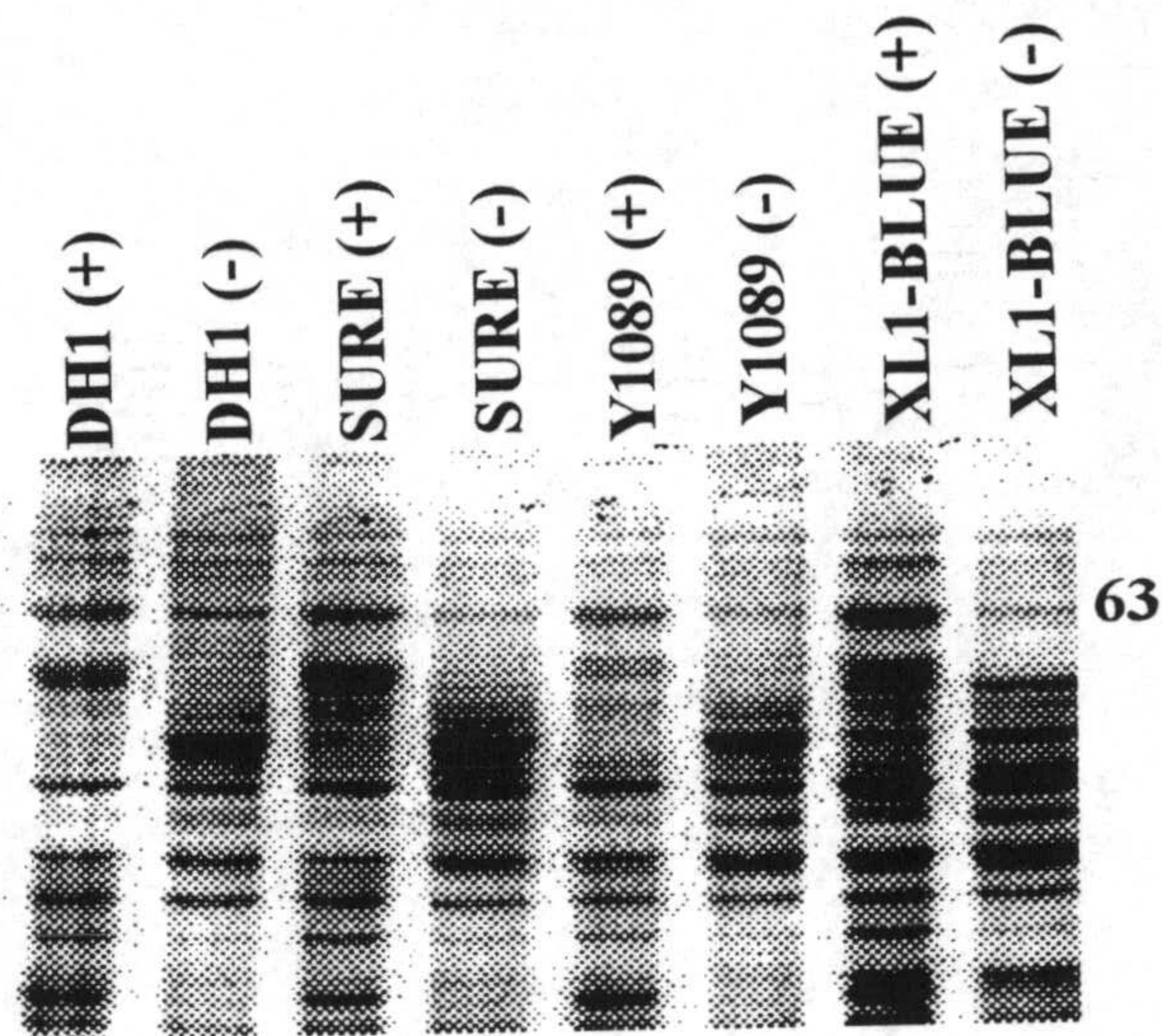


Fig. 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE, en el que se muestran extractos bacterianos recombinantes de diferentes cepas de *E. coli*. Los extractos de bacterias inducidas con IPTG (+) muestran la proteína recombinante GST-MAGE1 (63 kd), no existiendo diferencias significativas entre las diferentes cepas.

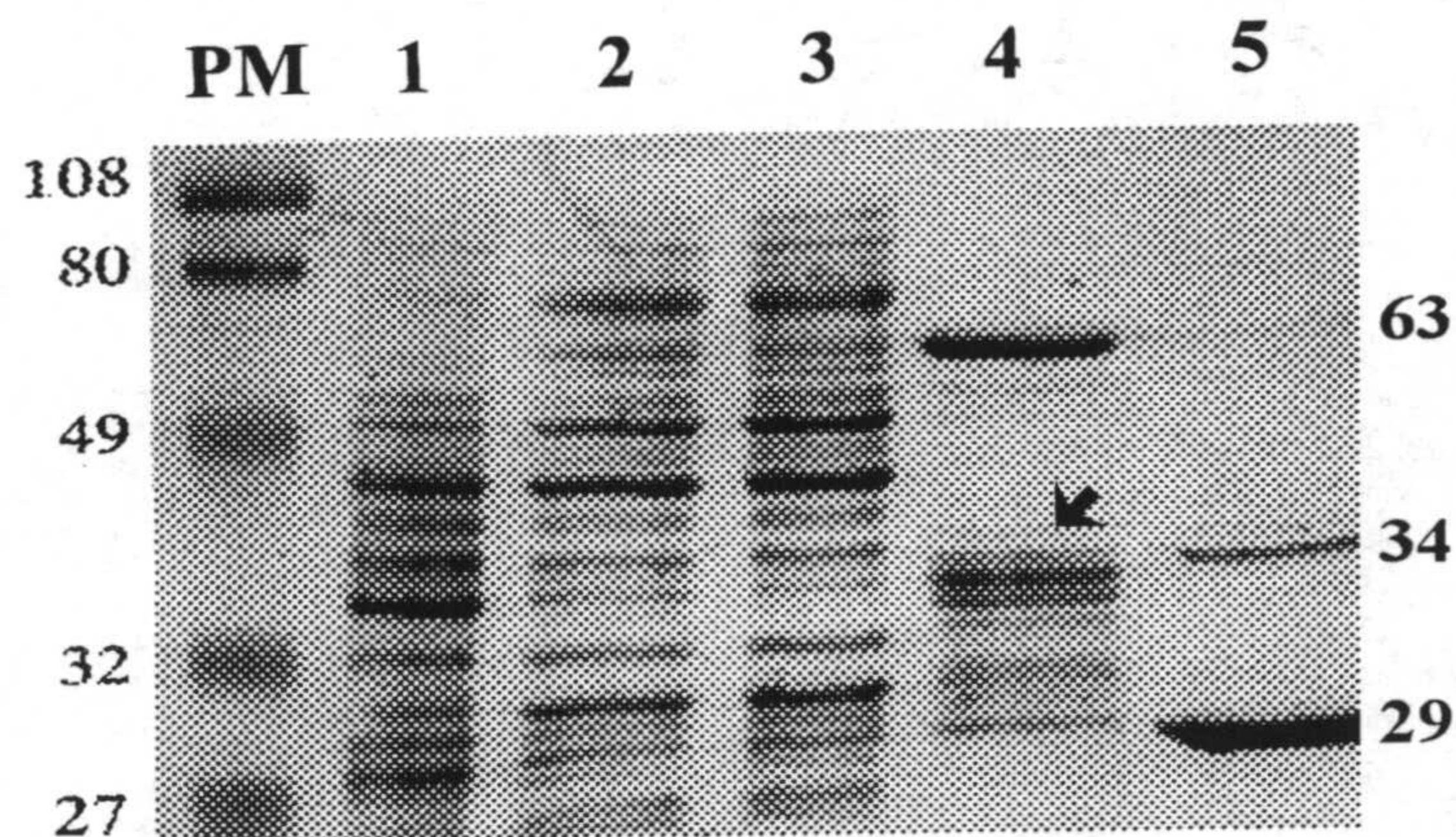


Fig. 5. La proteína recombinante GST-MAGE1 fue purificada a partir de extractos bacterianos de la cepa XL1-Blue. En el gel de poliacrilamida se muestran los extractos bacterianos previos a la purificación (2 y 3), en los que aparece la proteína recombinante después de 3 hrs. de inucción a t^a de 25°C. La línea 4 muestra la proteína recombinante posterior a su purificación, en la que se observa la degradación sufrida durante la síntesis, que en estas condiciones fue mínima. En la línea 5 se puede observar que tras digestión con la enzima trombina, la proteína recombinante queda escindida en MAGE-1 (34 kd) y Glutation-S-Transferasa (29 kd).

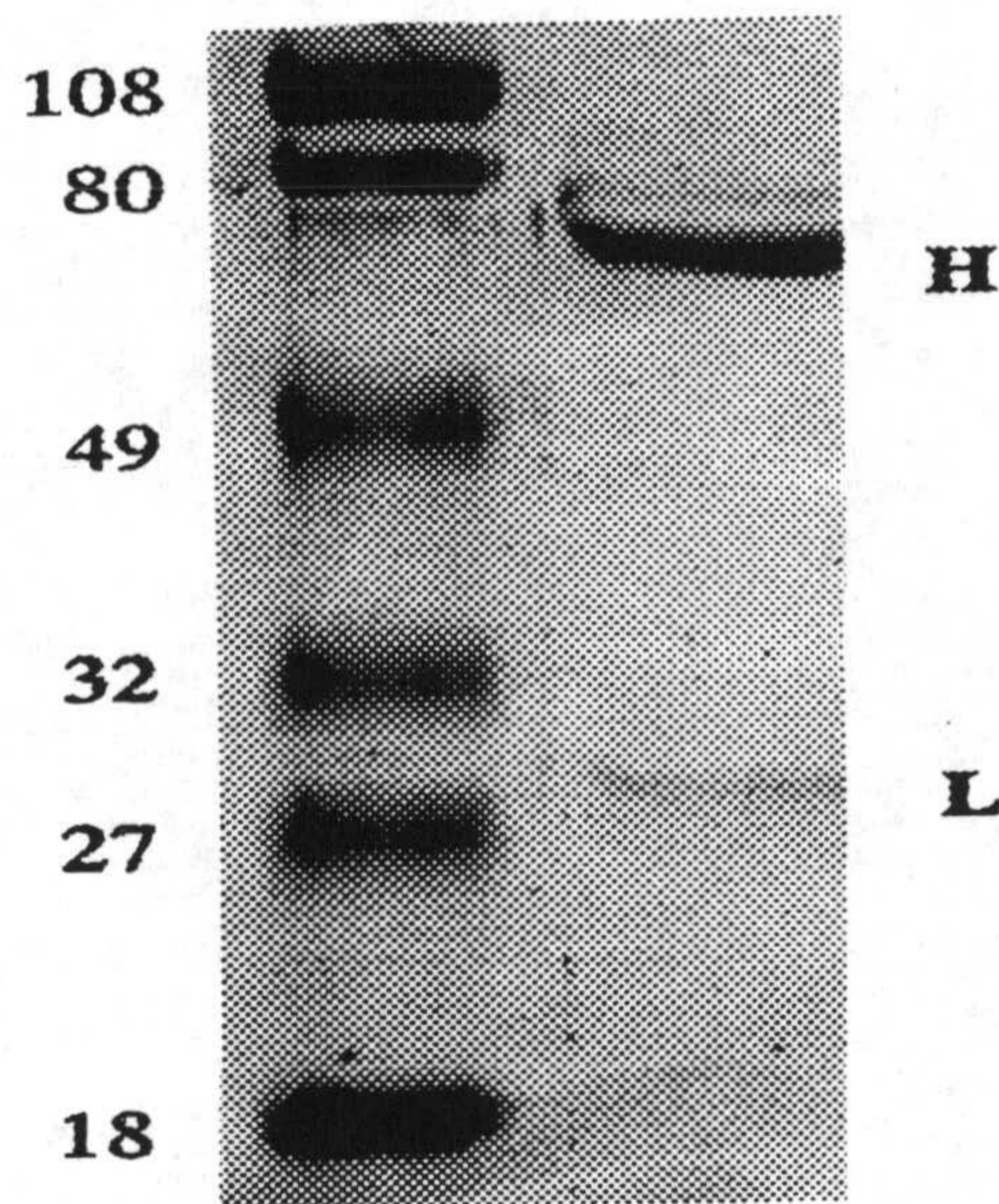


Fig. 6. Todos los sueros fueron preabsorbidos con extractos bacterianos. En el caso de los sueros de ave, se realizó una purificación de Igs específicas frente a la proteína MAGE-1 recombinante. En el gel de poliacrilamida se observan las cadenas pesadas (H) y ligeras (L) de las Igs purificadas.

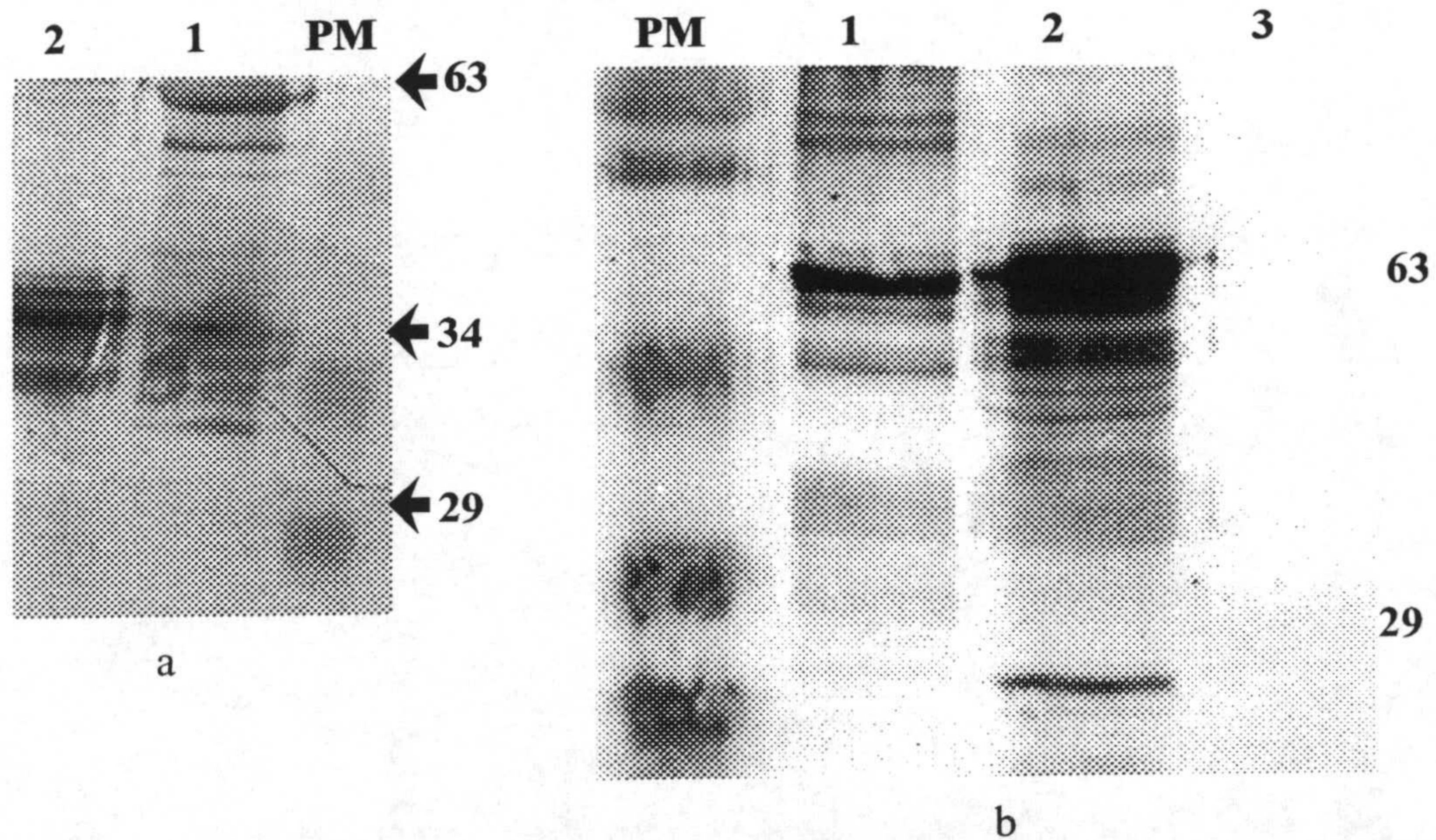


Fig. 7. a) Western blot realizado con antisuero de ratón. Línea 1, proteína recombinante MAGE1-GST. línea 2, proteína recombinante digerida con trombina, el antisuero reconoce la proteína MAGE-1 (34 Kd) pero no reconoce la GST (29 Kd). **b)** Western blot realizado con antisuero de pollo. Línea 1, proteína recombinante MAGE1-GST. Línea 2, extracto bacteriano recombinante. Línea 3, La glutaion transferasa tampoco es reconocida por el antisuero de ave.

Tabla 1. Expresión de la proteína MAGE en tejidos humanos normales y tumorales.

<u>TEJIDO NORMAL</u>	<u>EXPRESION DE MAGE</u>	<u>TEJIDO NEOPLASICO</u>	<u>EXPRESION DE MAGE</u>
Tejido nervioso	(-)	Astrocitoma Glioblastoma Ependimoma Meduloblastoma	(+) (+) (-) (-)
Piel	(-)	Nevus pigmentoso Melanoma maligno Carcinoma de células basales	(+) (+)
Hígado	(-)	Carcinoma hepático	(-)
Páncreas	(-)	Adenocarcinoma	(-)
Glándula adrenal	(-)	Adenoma Neuroblastoma	(-) (+)
Colon	(-)	Adenocarcinoma	(+)
Ovario	(+) ¹	Carcinoma seroso Tumor germinal	(-) (+)
Testículo	(+) ²	Tumor germinal	(+)
Placenta	(-) ³	Coriocarcinoma	(-)
Músculo esquelético	(-)	Rabdomiosarcoma	(-)

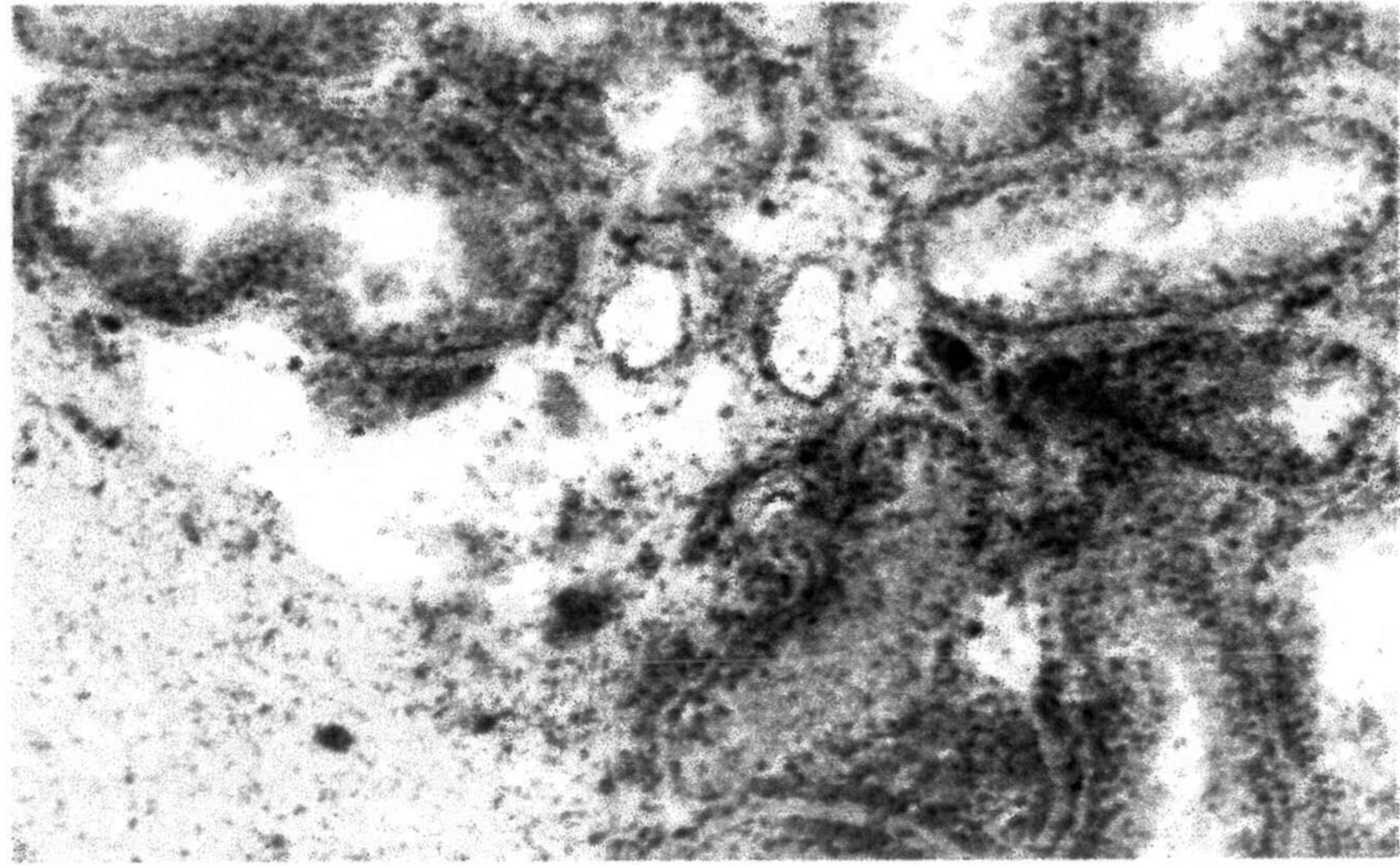
(Resultados obtenidos en inmunohistoquímica, utilizando antisuero (pollo) anti-MAGE-1)

1 = Las células luteinizadas del cuerpo lúteo eran débilmente positivas.

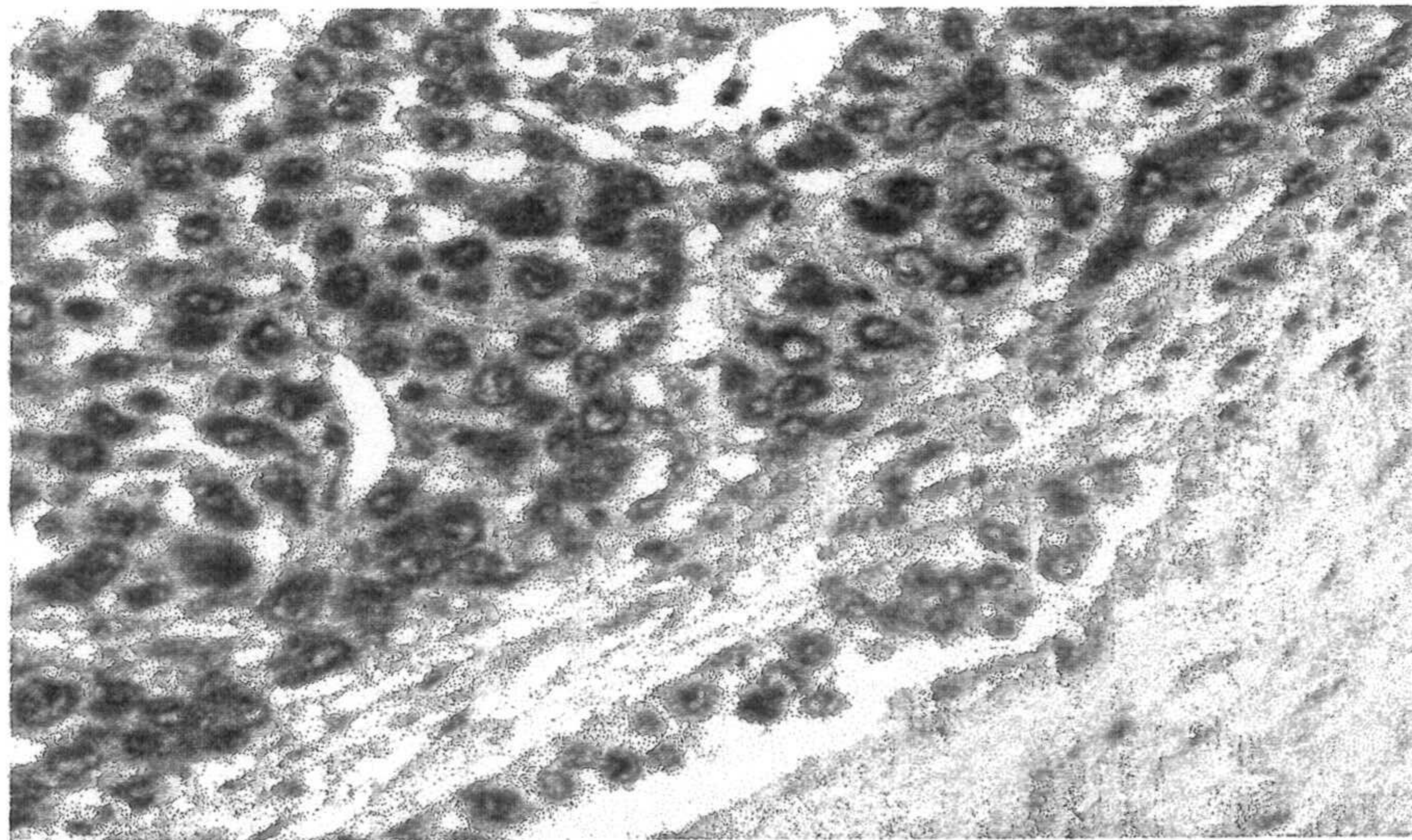
2 = Células germinales.

3 = Algunas células de la decidua eran positivas.

Se estudiaron un total de 43 muestras de normal y tejido neoplásico, siendo positivos: 6 de 14 melanomas, 2 de 2 nevus pigmentosos, 0 de 2 carcinomas de células basales, 1 de 4 neuroblastomas, 1 de 2 tumores germinal de ovario, 1 de 4 tumores germinales de testículo. El resto del estudio (+ o -), se refiere a una única muestra analizada.

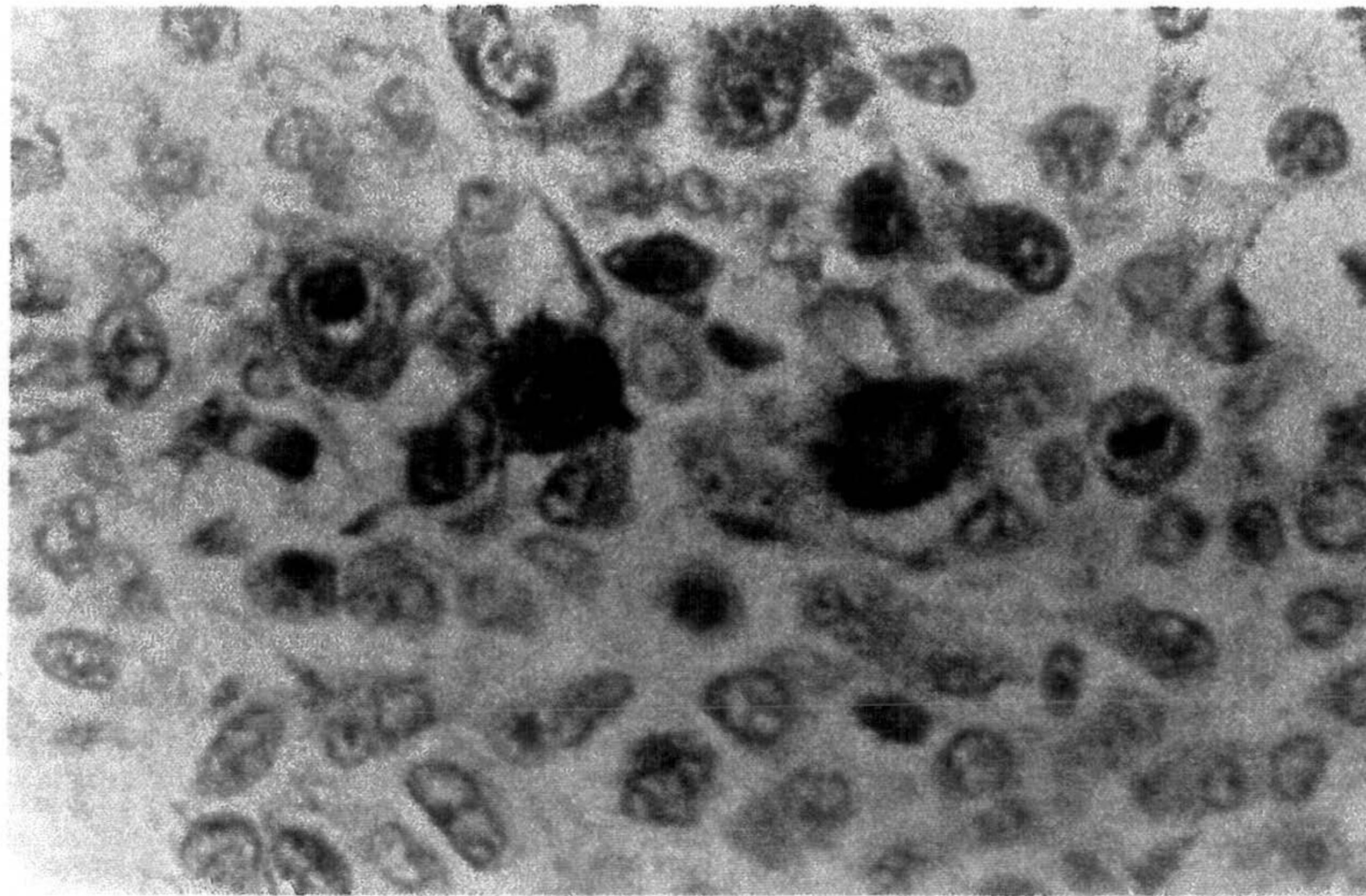


a)

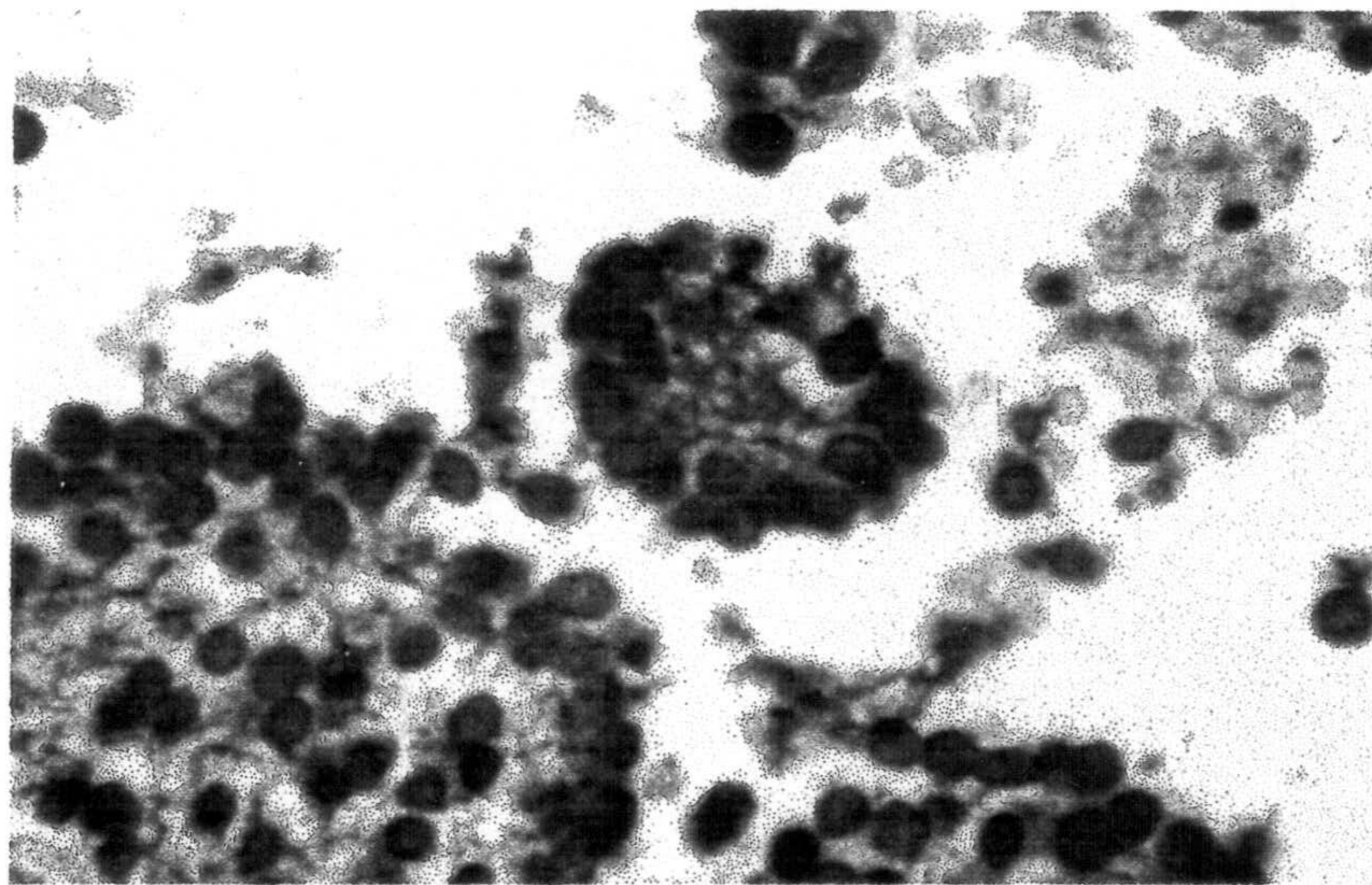


b)

Fig. 8. Técnica de Inmunohistoquímica, realizada sobre dos secciones histológicas, en la que se utilizó antisuero anti-MAGE-1 de ave. **a)** Sección de tejido testicular. Se puede observar, tras revelado con sustrato de fosfatasa alcalina, que la reacción se concentra mayoritariamente sobre el epitelio germinal de los tubos seminíferos, concretamente en la zona mas externa. **b)** Sección histológica de melanoma. Tras revelar, utilizando el sustrato de la peroxida, el tejido tumoral presentó una fuerte reacción, que contrastaba con la debilidad del tejido adyacente.



a)



b)

Fig. 9. Técnica de inmunohistoquímica, realizada sobre secciones histológicas, en la que se utilizó antisuero anti-MAGE-1 de ave y se reveló con sustrato de peroxidasa. a) Sección de melanoma. El antisuero mostró un patrón de reacción heterogeneo en la masa tumoral. b) Sección de neuroblastoma. Al igual que en melanoma, la masa tumoral presentaba un patrón heterogeneo de reacción con el antisuero.

ESTUDIO DE LA PROTEINA RECOMBINANTE MAGE-1 EN SISTEMA DE EXPRESION EUCARIOTA.

Las dificultad que supuso la síntesis de la proteína recombinante en sistema procariota, así como su posterior manipulación, hizo necesaria una aproximación al comportamiento de la proteína recombinante en sistemas eucariotas, tanto en su síntesis, como en su posterior localización subcelular.

Se utilizó el sistema de expresión en Baculovirus, lo que implicaba la transferencia de la fase de lectura abierta completa del gen Mage-1 al ADN viral (AcMNPV), y posterior trasfección a la célula huésped (líne celular Sf9, Spodoptera frugiperda).

1. CLONACION DEL GEN MAGE-1 EN EL VECTOR VIRAL.

Previamente el gen fue clonado en un vector plasmídico denominado pBBHISA en un punto de inserción BamHI/HindIII.

Se partió de un amplificado de PCR obtenido a partir del plásmido pGEX-2T-MAGE-1, que había sido previamente clonado y utilizado en la síntesis de la proteína recombinante en sistema procariota.

Una de las características fundamentales de éste nuevo plásmido eran las secuencias que flanqueaban al gen insertado, ya que eran homólogas de otras

presentes en el ADN viral y eran fundamentales tanto en la transferencia del gen en cuestión como en su expresión.

Respecto al vector viral, su característica fundamental era la presencia de un gen que codificaba una proteína de inclusión, poliedrina, y que en una célula infectada suponía el 50% de las proteínas totales. La potencia del promotor de este gen era clave en la estrategia de la producción de la proteína recombinante, ya que esta consistía en la sustitución del gen de la poliedrina por el gen Mage-1

a) Cotransfección del plásmido PBBHISA-Mage-1 y el ADN viral. Evidencia de la infección celular.

La cotransfección del plásmido portador del gen recombinante y el ADN viral tenía la finalidad, además de la infección celular, de transferir el gen recombinante al ADN viral. Esta transferencia fue el resultado de una recombinación homóloga de las secuencias flanqueantes del gen MAGE-1 y del gen de la Poliedrina.

El porcentaje de recombinación esperado, según las condiciones de trasfección, era del 10%, por tanto el 90% de las células infectadas, lo eran por el virus salvaje. Este porcentaje esperado, se confirmó como porcentaje observado después de la cotrasfección (**fig. 10 y 11**).

b) Selección del virus recombinantes.

En la selección de los virus recombinantes se utilizó el marcador β -galactosidasa, que junto con el gen MAGE-1 fue también transferido al ADN viral. La selección se realizó en placas de agar, en las cuales se observaba la dispersión de las colonias recombinantes como puntos azules.

Varias de estas colonias fueron aisladas y cultivadas de forma independiente. El análisis del virus que aparecía en el sobrenadante fue analizado mediante PCR, que mostró la alta pureza de virus recombinante, con escasa contaminación del virus salvaje (fig. 12).

2. LOCALIZACION DE LA PROTEINA RECOMBINANTE MAGE-1.

Para el estudio de la proteína recombinante, era esencial que todas las células estuviesen infectadas, de forma que la proteína MAGE-1 representara un porcentaje importante dentro del extracto celular. Esto se consiguió infectando las células a una multiplicidad de infección de 5, es decir, 5 virus por célula.

a) Transcripción de la proteína recombinante MAGE-1.

Al contrario que en sistema procariota, la proteína Mage-1 era sintetizada de forma íntegra, sin proteína de fusión. De igual forma la síntesis tenía lugar sin necesidad de inductor, gobernada por el promotor del gen de la poliedrina.

El análisis del ARN (RT-PCR), extraído de cultivos celulares infectados, mostró la existencia de ARNm correspondiente al gen MAGE-1. Esto era reflejo de una perfecta recombinación genética y de una buena transfección, que ya se hizo evidente en la selección viral por medio del marcador de β -galactosidasa.

b) Evidencia de la proteína recombinante MAGE-1.

La existencia de la proteína Mage-1 se confirmó mediante el análisis de extractos celulares pertenecientes a tiempos de incubación diferentes de un mismo cultivo sincrónico.

El análisis de los extractos se hizo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Para ello se separaron las fracciones hidrosolubles y liposolubles (membranas y elementos asociados).

La proteína Mage-1 apareció, con un tamaño esperado de aproximadamente 34 kd, en la fracción liposoluble (**fig. 13**).

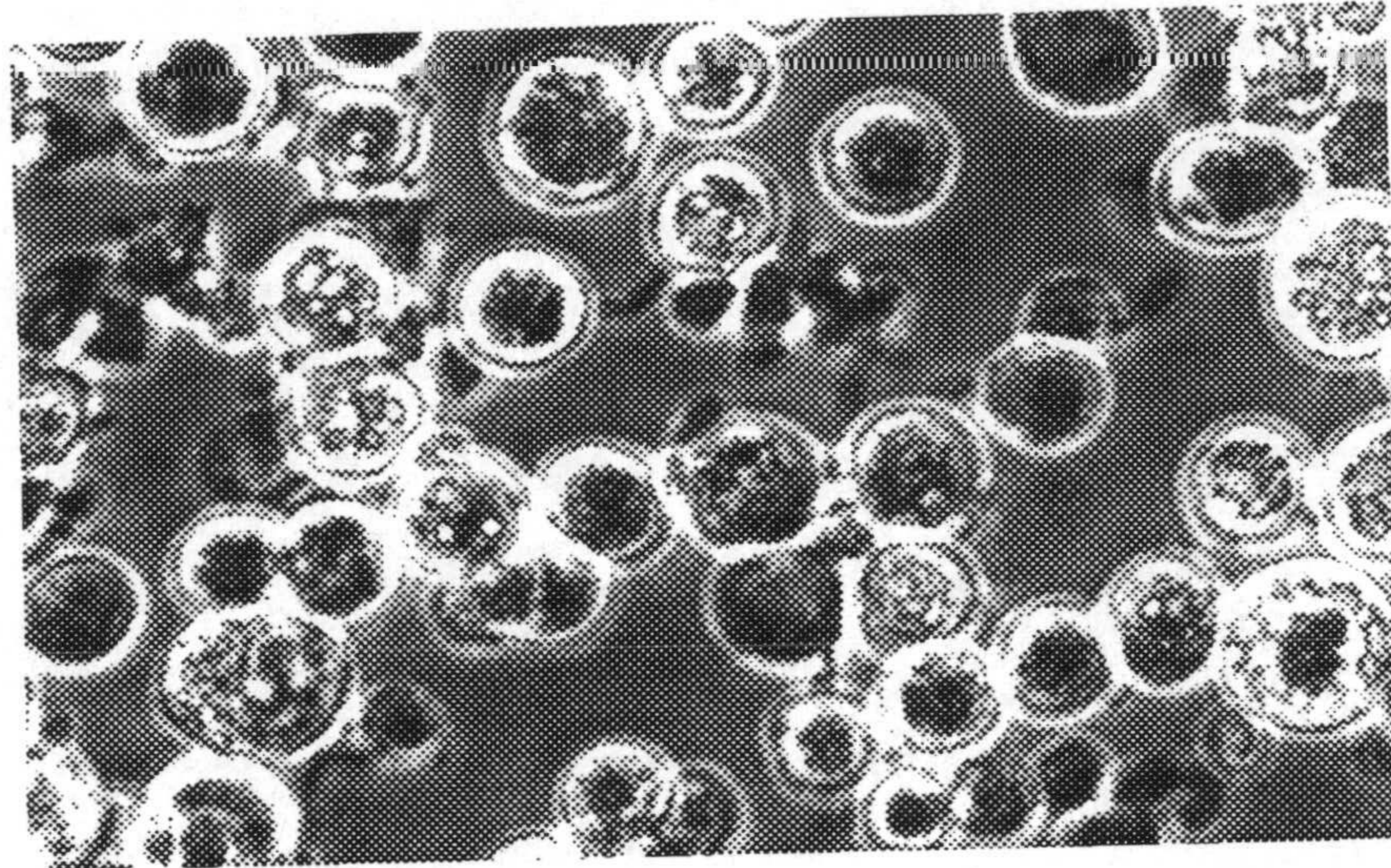


Fig. 10. Aspecto de las células Sf9 72 horas después de la cotransfección. Las inclusiones de Poliederina aparecen como gránulos refringentes.

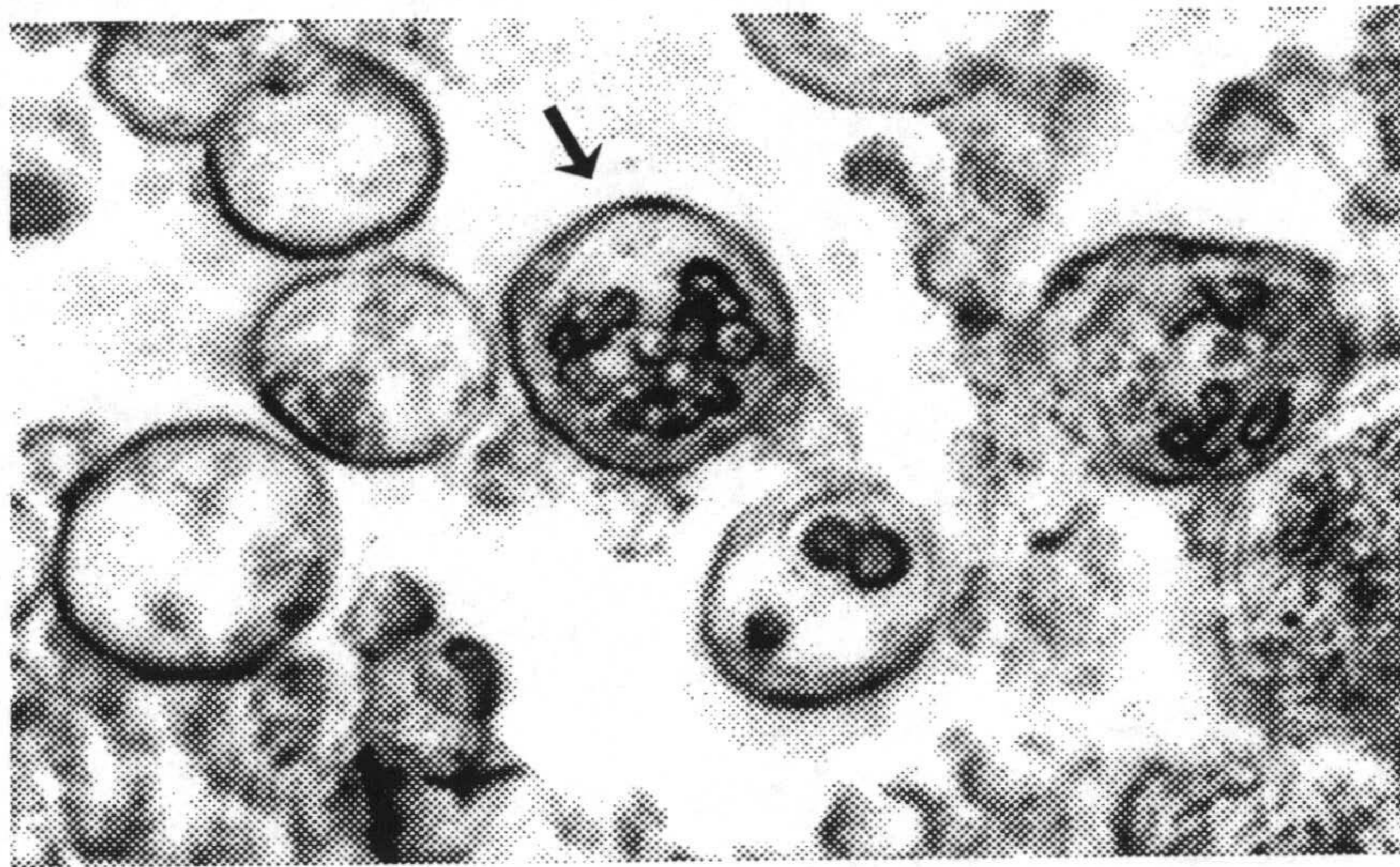


Fig. 11. Grupo de células Sf9 infectadas . Las inclusiones de Poliedrina (flecha) identifican a las células infectadas por el virus salvaje. Las células recombinantes no presentan dichas inclusiones.

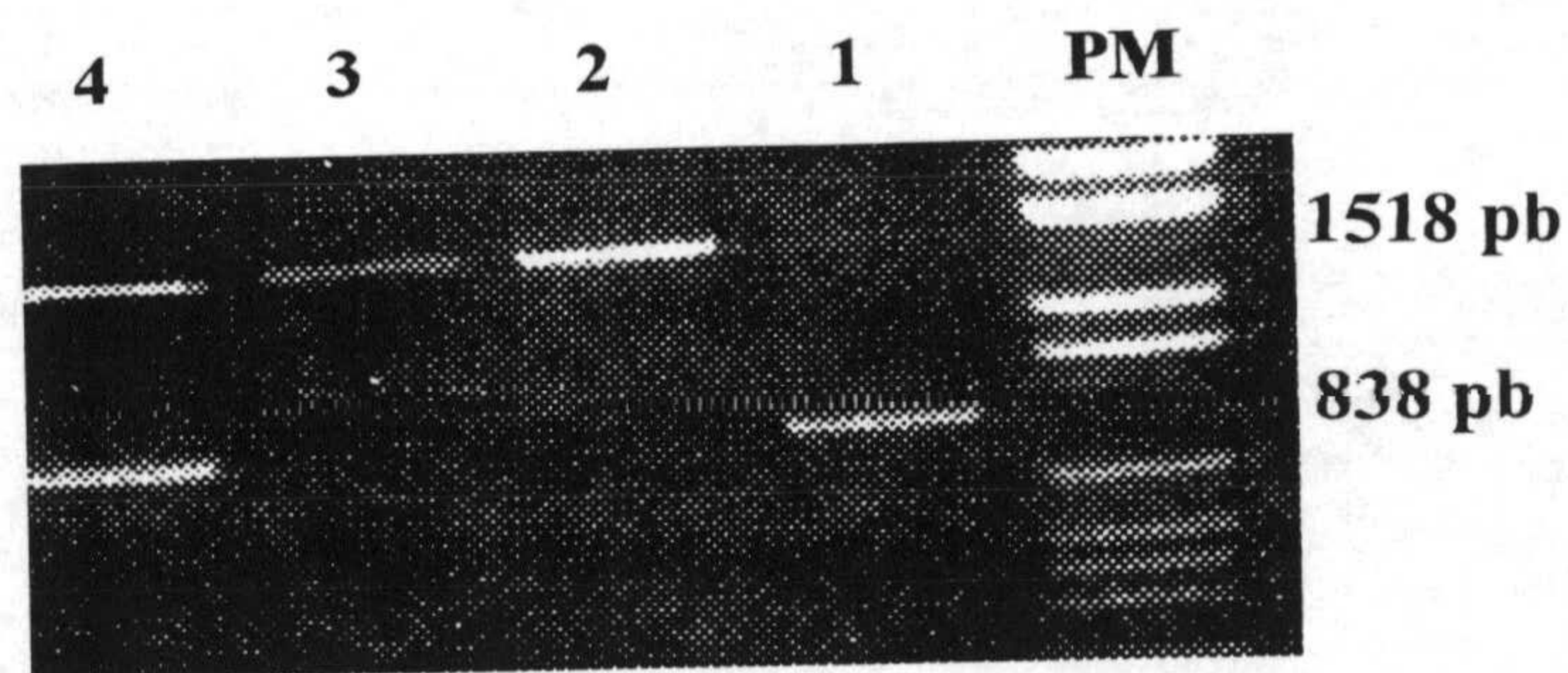


Fig. 12 . Resultado de PCR realizada a partir de ADN viral. Los primers utilizados fueron siempre BCVFW/BCVRW. Línea 1, ADN de virus salvaje. Líneas 2 y 3, ADN perteneciente a dos clones de virus recombinante, después de dos selecciones consecutivas en placa. Línea 4, ADN de una mezcla de virus salvaje y recombinante. La banda de 838 pb corresponde al virus salvaje y la de 1518 al virus portador del gen recombinante Mage-1. El clon 2 se utilizó para la obtención de la proteína recombinante MAGE-1.

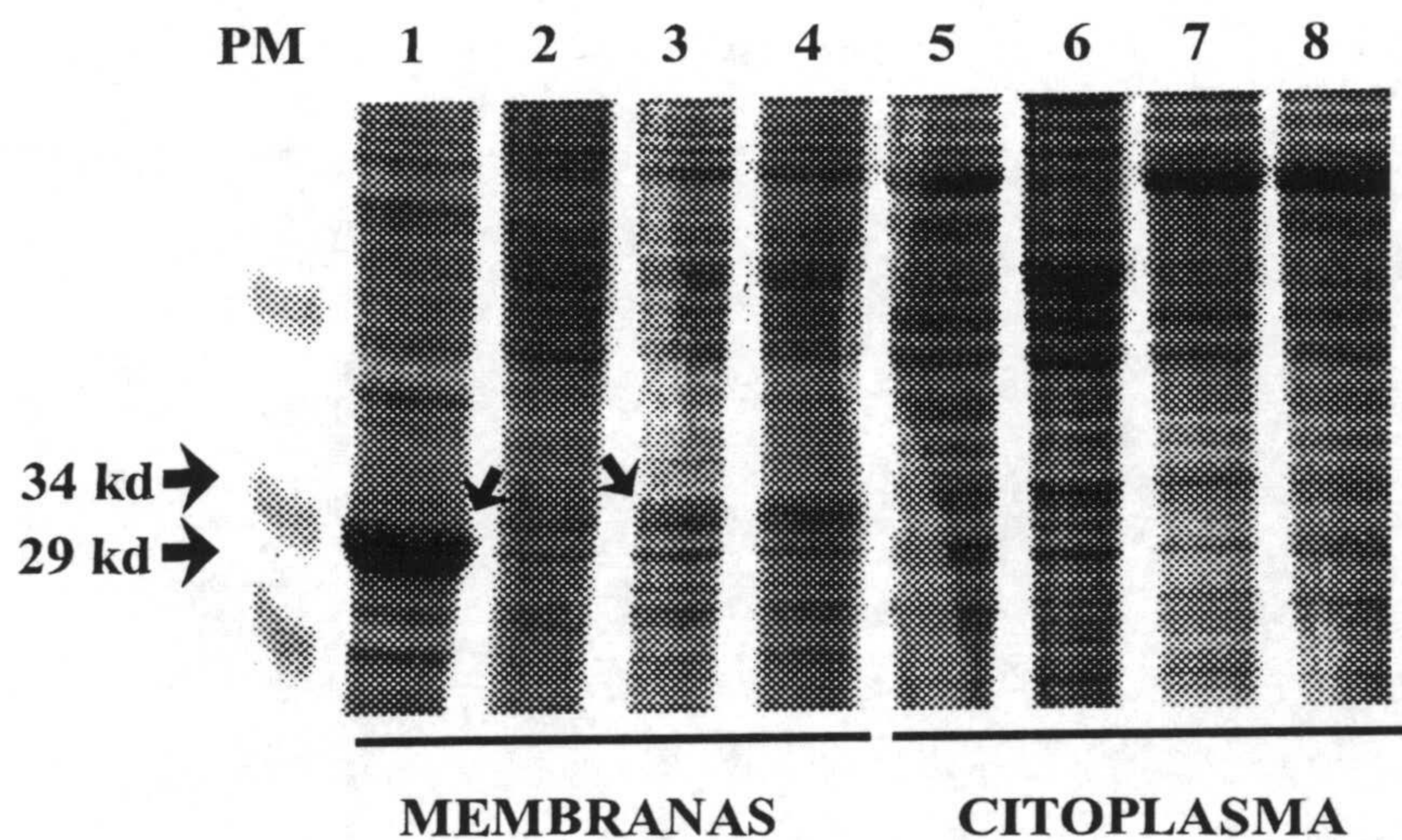


Fig. 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE de extractos celulares Sf9. Los extractos celulares fueron separados en fracciones membranosas y fracciones solubles. En el análisis de los extractos recombinantes se observa que la proteína MAGE-1 queda retenida en la fracción membranosa (Línea 3, 48 hrs. de cultivo. Línea 4, 72 hrs. de cultivo). Las fracciones solubles, líneas 7 y 8, carecían de la proteína recombinante. Línea 1, extracto celular que contiene virus salvaje, el extracto soluble carece de la proteína Poliedrina (línea 5). Líneas 2 y 6, extractos celulares no infectados.

EXPRESION DEL ANTIGENO MAGE-1 EN LA LINEA K562.

1. EXISTENCIA DE DOS VARIANTES DE LA MISMA LINEA.

K562 es una línea hematopoyética con características eritroides obtenida a partir de una crisis blástica resultado de una leucemia mieloide crónica, y derivada de la ATCC (American Type Culture Collection).

Nuestro laboratorio dispone de dos variantes de esta línea que difieren entre otros aspectos en la expresión del antígeno Mage-1. La variante positiva fue denominada K562A, mientras que la negativa se denominó K562B (**fig. 14**).

2. AMBAS VARIANTES SON LA MISMA LINEA.

Debido a las diferencias observadas entre ambas variantes, y teniendo en cuenta que convergieron en nuestro laboratorio por vías diferentes (K562A-ATCC-, K562B-Inst. Ludwig para la Investigación del Cáncer-), fue necesario determinar que eran idénticas en su origen. Para ello se realizaron los siguientes estudios: Tipificación genómica, análisis del marcador BCR/ABL y estudio inmunofenotípico.

La tipificación genómica, realizado mediante dot-blot reverso, mostró que las dos variantes tenían el mismo tipaje genómico para la molécula de clase-II HLA-DR(DR3/-)(**fig. 15**). Mediante este estudio se descartó la posibilidad de una contaminación de la línea original, puesto que la heterogeneidad en este sentido determinaría un tipaje múltiple en esta molécula de clase II, ya que la probabilidad de coincidencia en tipaje de dos líneas de origen diferente es prácticamente nula.

Ambas variantes presentaban el reordenamiento ABL/BCR, consecuencia de una translocación entre los cromosomas 9 y 22, este reordenamiento es un marcador característico de la línea K562 (**fig. 16**). Si el estudio anterior descartaba la posibilidad de una contaminación de la línea que generase la variación, este estudio reafirmaba a ambas líneas como K562.

El inmufenotipo de las dos variantes coincidía para los mismos marcadores de membrana (GP-A, CD13, CD33, CD11b, CD45 y CD15). Aunque el inmufenotipo era un punto diferencial entre ambas variantes, lo era también de identidad, ya que coincidían en el tipo de marcador que expresaban, si bien diferían en la intensidad de expresión (**fig. 17**).

3. DIFERENCIAS ENTRE LAS DOS VARIANTES.

A pesar de que las dos variantes son la misma línea, las primeras evidencias indicaban la existencia de diferencias notables entre ambas. Estas diferencias podían observarse tanto en el comportamiento en cultivo como en ciertas características fenotípicas, entre las que destacaba la expresión del antígeno Mage-1.

Los primeros rasgos diferenciales eran visibles macroscópicamente, entre éstos estaba el comportamiento en cultivo, ya que mientras que la variante K562A crecía mayoritariamente en suspensión y existía una tendencia general al agrupamiento, la mayoría de las células de la variante K562B se adherían al plástico.

Otro rasgo distintivo era la síntesis de globina, ésta era mayor en la variante K562B, ya que el pellet de células tras centrifugación mostraba un color rojo diferencial.

El estudio inmunofenotípico de marcadores de membrana mostró que K562B presentaba una mayor expresión de ciertos marcadores (GP-A, CD45, CD33, CD13 y CD11b), mientras que otros permanecían inalterados(CD15).

4. DIFERENCIACION DE K562A MEDIANTE LOS MODULADORES

ARAC(1- β -D-arabinofuranosylcytosine), HEMINA Y PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetato).

K562 es una línea que puede adquirir, mediante diferentes moduladores, características de distintos linajes hematopoyéticos. Sus características eritroides podían ser realizadas mediante los moduladores AraC y Hemina, mientras que el ester de forbol PMA la derivaba hacia una línea con características monocíticas.

El modulador AraC consiguió diferenciar la variante K562A hacia un linaje eritroide que mostraba unas características inmunofenotípicas muy similares a las que presentaba la variante K562B, entre las cuales se encontraban, una mayor expresión de los marcadores GP-A, CD33, CD13, CD45 (**fig. 18**) y aumento en la síntesis de globina. Sin embargo había características diferenciales tales como el cese proliferativo inducido por el AraC (**fig. 19**), y la no disminución drástica en la expresión del antígeno Mage-1 (**fig. 20**).

La Hemina consiguió igualmente diferenciar la variante A hacia un linaje eritroide, pero seguía persistiendo como característica diferencial entre ambas variantes la expresión del antígeno Mage-1.

El tratamiento con PMA transformó K562A en una línea con características monocitoides, aunque no se consiguió tampoco la disminución drástica del antígeno Mage-1.

Estas experiencias mostraron la compatibilidad del antígeno Mage-1 con la diferenciación celular en este sistema, independientemente de la posible regulación génica que pudiese existir, la cual no era apreciada mediante la técnica de RT-PCR.

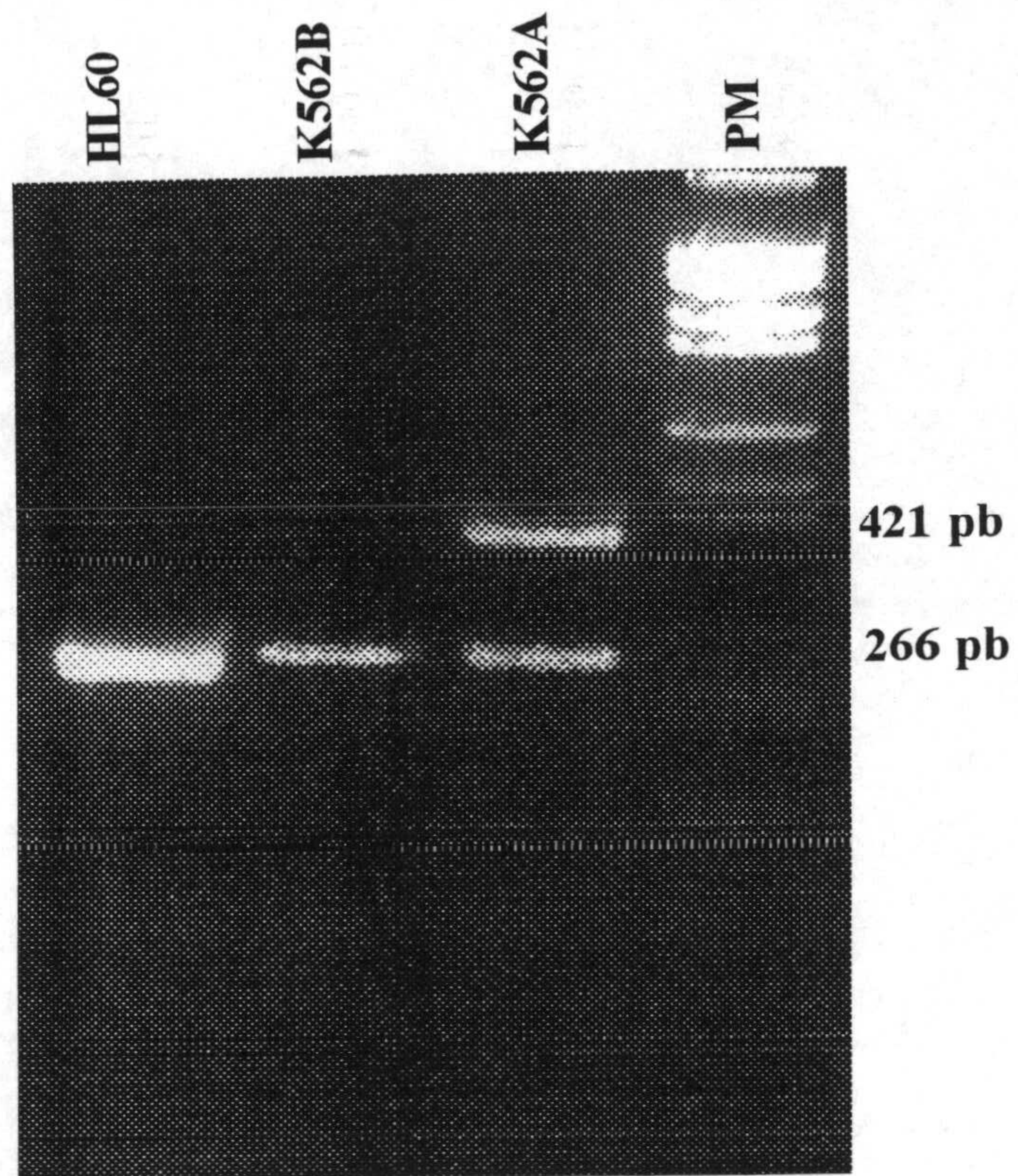


Fig. 14. Análisis de la expresión del gen Mage-1, mediante RT-PCR, en las variantes A y B de la línea K562. Se utilizó como control negativo la línea HL60. La variante K562A expresaba el antígeno MAGE-1 (421 pb), mientras que la variante K562B fue negativa. El estado óptimo del ADNc se verificó mediante la amplificación de la beta-actina.

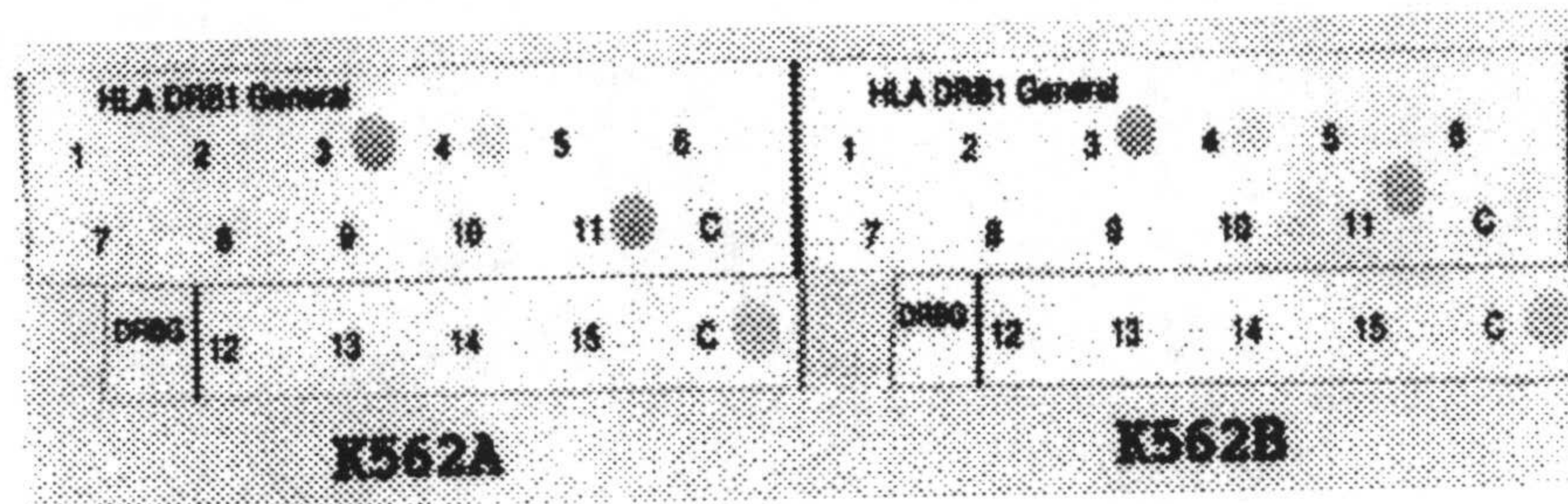


Fig. 15. Tipificación genómica, dot-blot reverso, realizada a las dos variantes de la línea K562. Se observa un patrón de reacción similar en ambas variantes, que corresponde con la especificidad DR3/-.

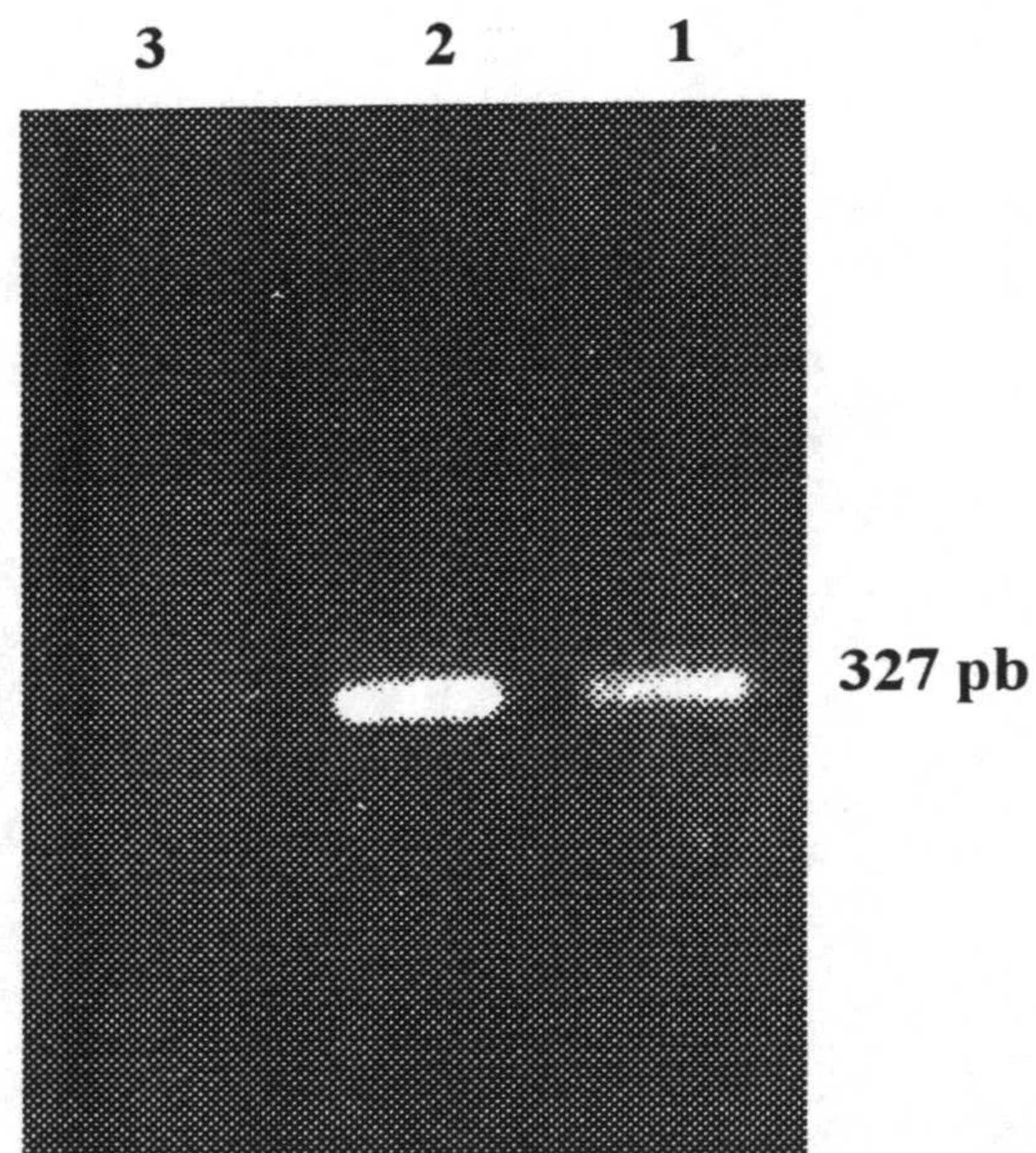


Fig. 16. Confirmación de la identidad de ambas variantes como la línea K562. Tanto la variante A (1), como la variante B (2) presentaban el reordenamiento ABL/BCR (327 pb) característico de la línea K562. La línea HL60 (3) utilizada como control no presentó dicho reordenamiento.

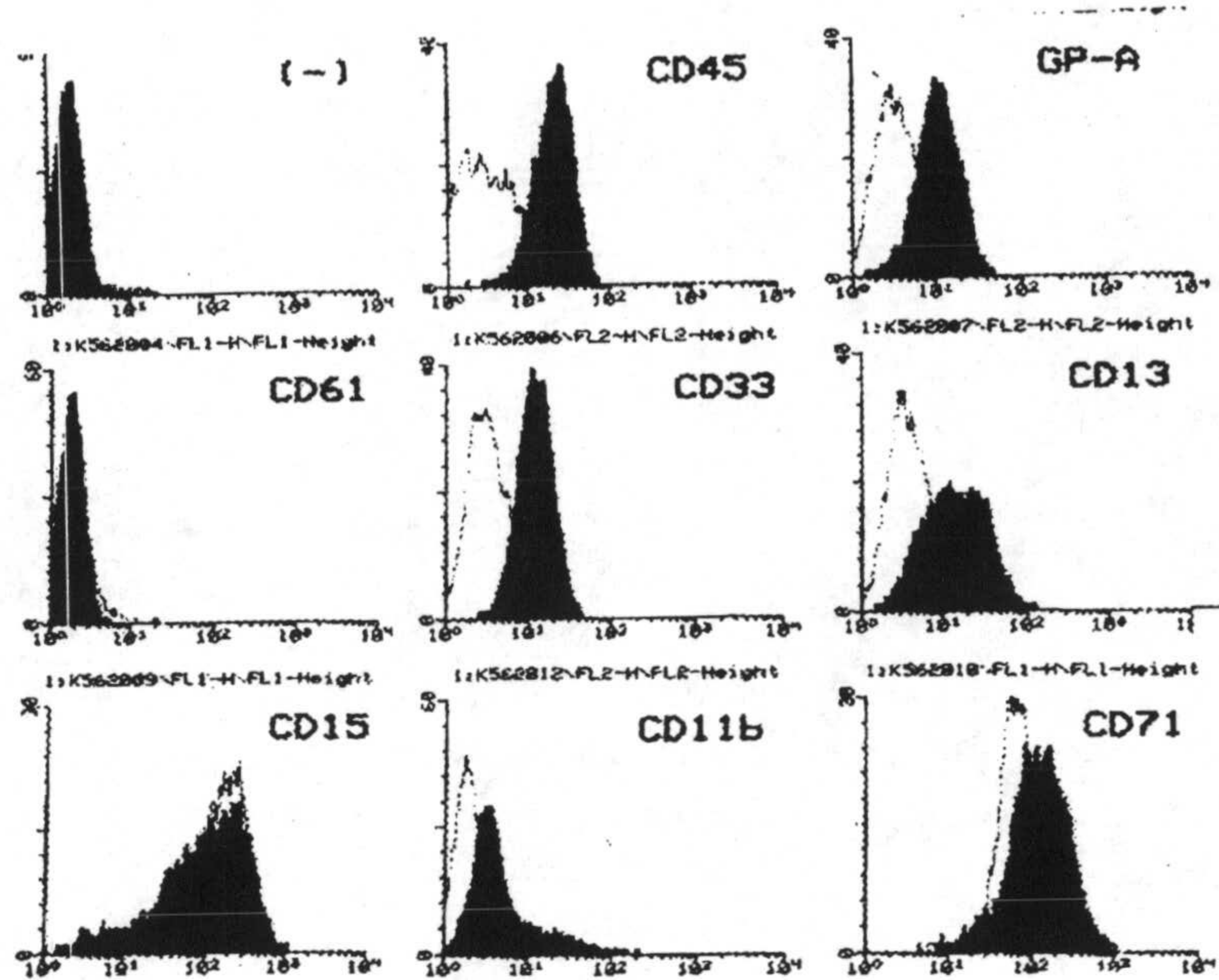


Fig. 17. Comparación del perfil inmunofenotípico, de algunos marcadores superficiales, de las variantes A (área hueca) y B (área sólida) de la línea K562. K562B presenta una expresión más alta de algunos de los marcadores analizados, lo cual concuerda con un estado de mayor diferenciación eritroide.

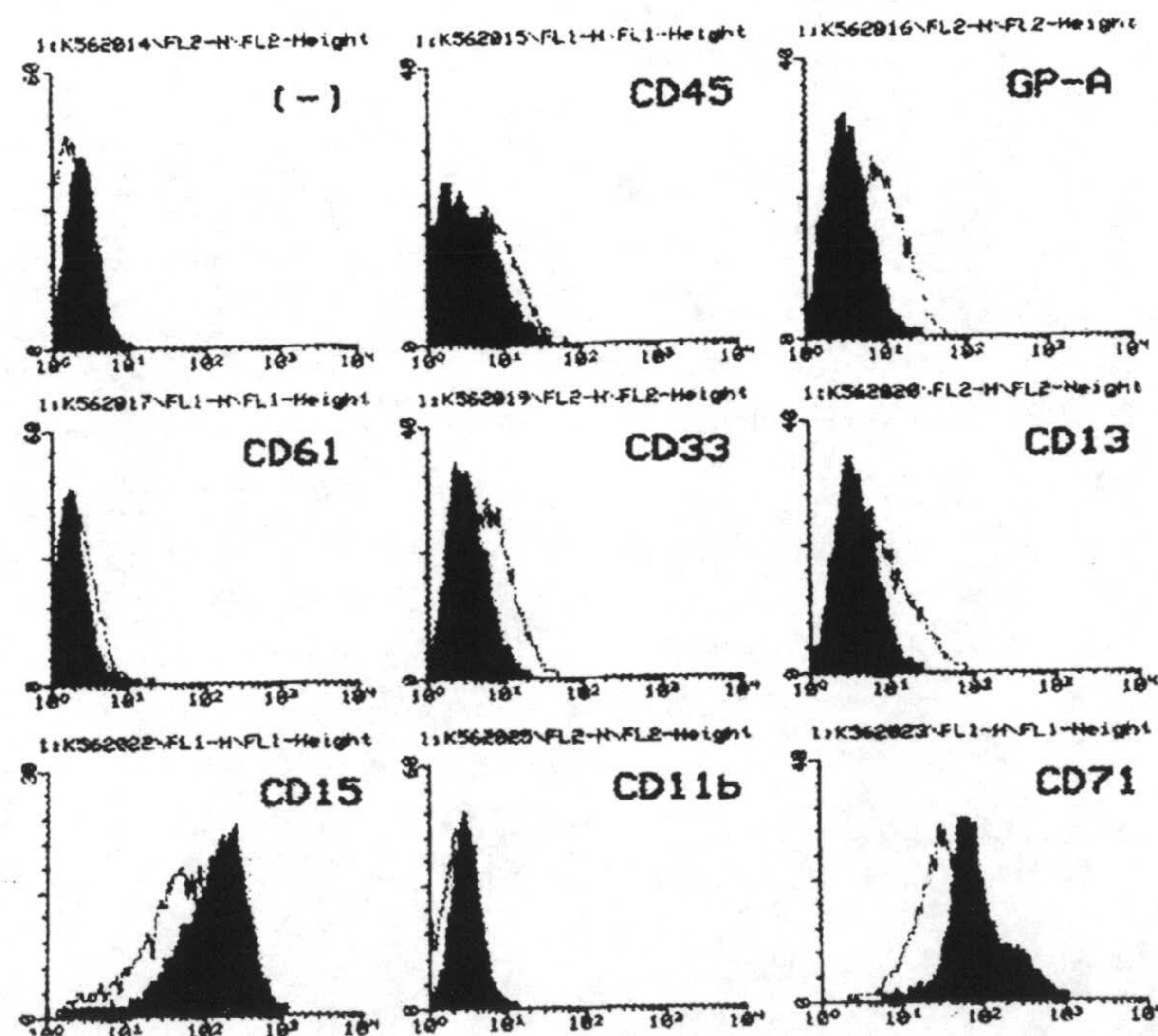


Fig. 18. Comparación del perfil inmunofenotípico de la línea K562A, antes (área sólida) y después (área hueca) del tratamiento con Ara-C. El inductor Ara-C, logró recuperar la expresión de de algunos marcadores eritroides. El perfil inmunofenotípico se asemejaba al perfil que presentaba la línea K562B en estado basal.

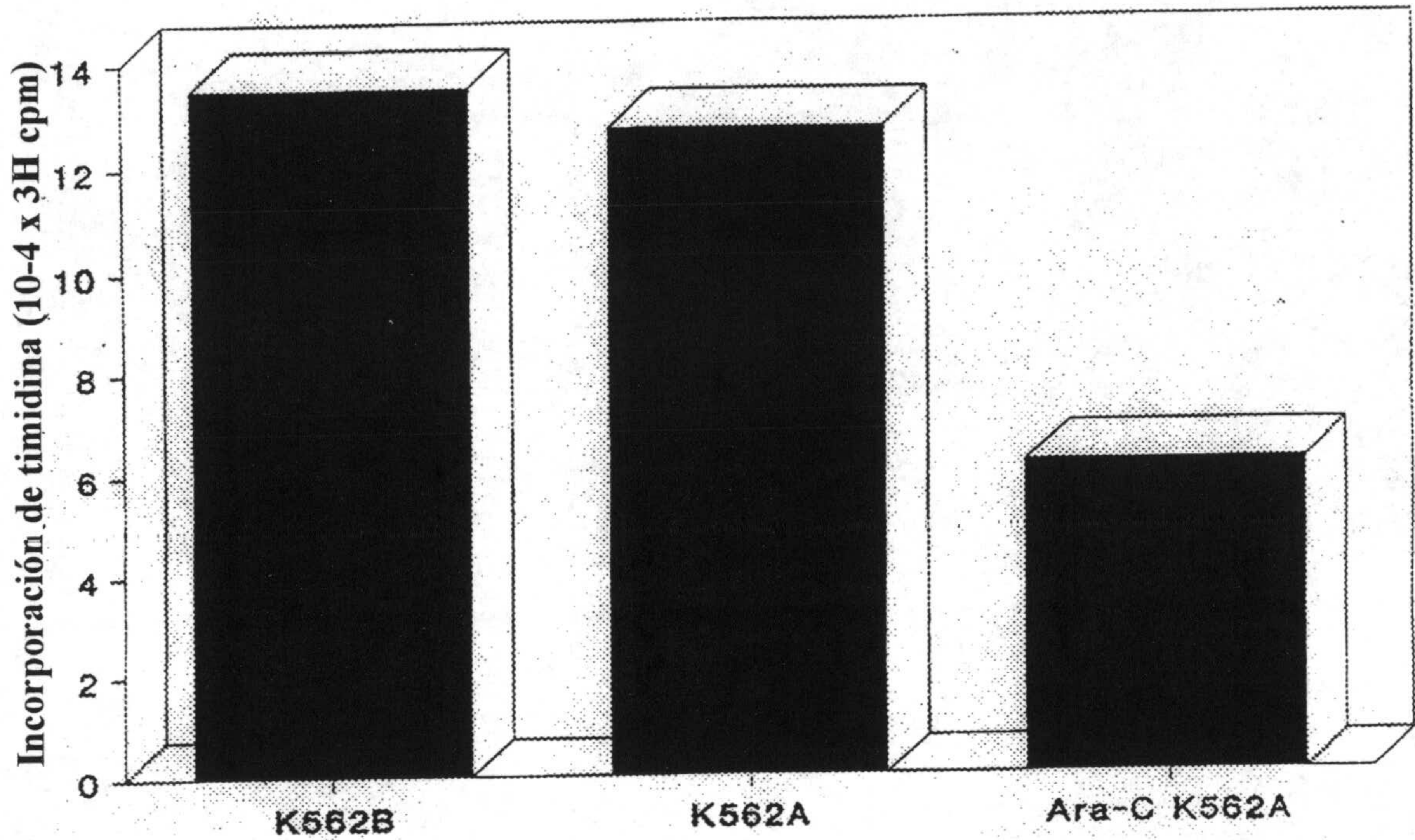


Fig. 19. Medida de la actividad proliferativa de las variantes K562B, K562A y K562A-Ara-C. La actividad proliferativa de las dos variantes en condiciones basales es igual, mientras que el tratamiento con Ara-C reduce significativamente la proliferación a las 72 hrs.

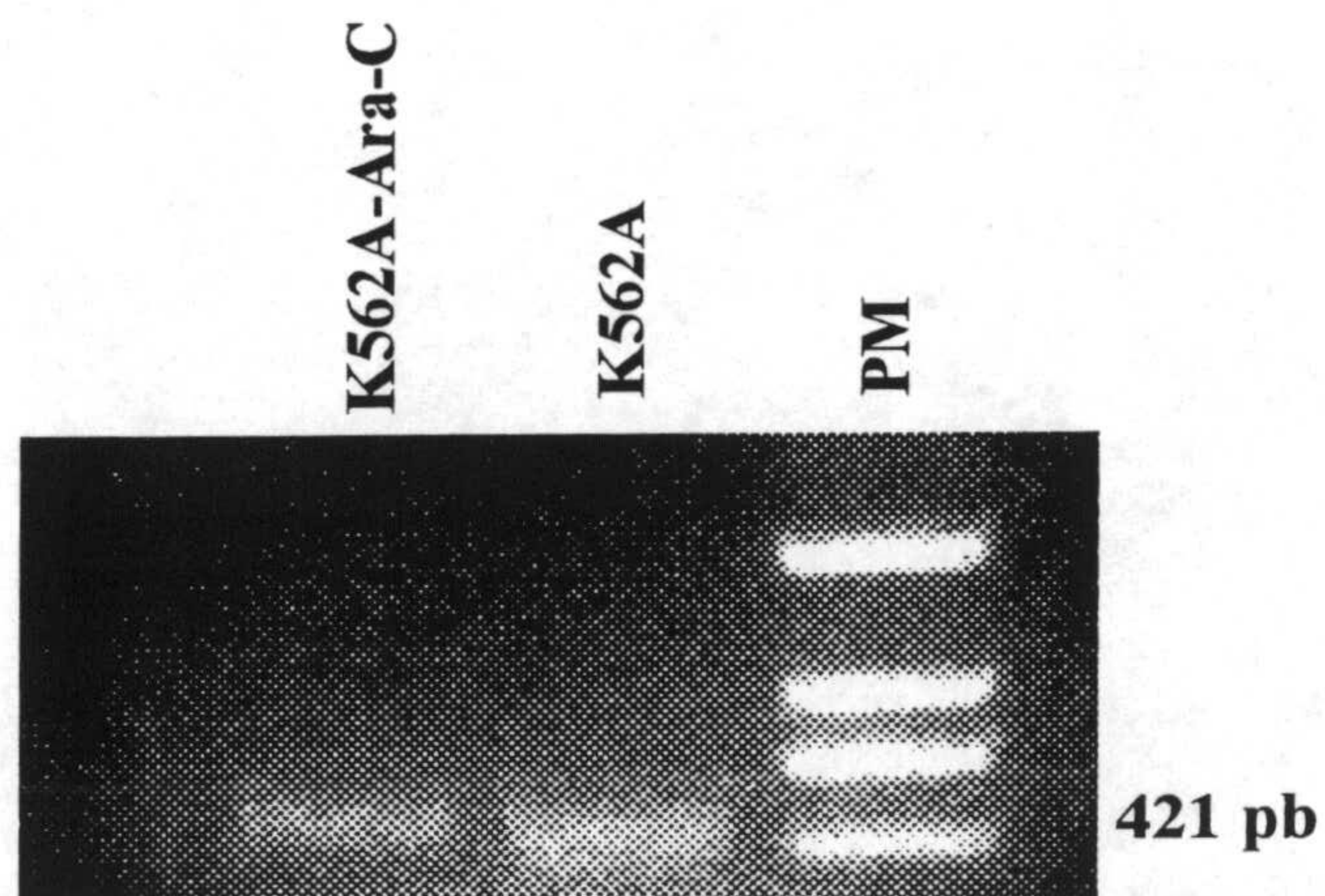


Fig. 20. Análisis de la expresión del gen Mage-1 en la línea K562A después del tratamiento con Ara-C. La expresión del antígeno permanece inalterada.

ESTUDIO DEL PROMOTOR DE MAGE-1 EN LINEAS DE DIFERENTE ORIGEN HISTOLOGICO.

1. ESTUDIO A NIVEL DE METILACION.

a) Efecto del agente desmetilante 5-Aza-2'-deoxiCitidina (DAC).

Se conoce que la metilación forma parte de la regulación de la expresión del gen Mage-1, sin embargo queda aun por resolver si el promotor de Mage-1 está directamente implicado, y si es así, que regiones pueden tener una especial relevancia en la regulación por metilación del gen.

La desmetilación mediante el agente Aza-dC ha sido capaz de recuperar, en ciertas líneas, la expresión del antígeno Mage-1 (Weber y col. 1994). En este sentido nuestros resultados confirman la recuperación antigénica de la líneas LB23 y el aumento de la expresión en la línea LB37, cuando fueron tratadas con el agente desmetilante; fue imposible, sin embargo, la recuperación en otras líneas tales como la línea HL60 (**tabla 2**)(**fig. 21**).

b) Estudio mediante Southern blot del perfil de metilación del promotor de Mage-1.

La descripción reciente del promotor del gen Mage-1 (De Smet y col. 1995)(**fig. 22**), así como su análisis, ha mostrado la existencia de potenciales puntos de metilación, algunos de ellos localizados en zonas que tenían una especial relevancia en la actividad promotora. La región denominada como B (-55 a -42) era responsable de gran parte de la actividad del promotor. Esta región junto a la región B' (-69 a -55) presentaba una secuencia diana para la enzima HpaII, que determinaba la existencia de dos puntos potenciales de metilación que podían ser analizados mediante digestión enzimática.

Con este estudio de Southern blot hemos querido averiguar si la metilación podía tener un efecto cis-regulador sobre el promotor de Mage-1, comparando el perfil de metilación de las diferentes líneas tumorales, así como de leucocitos y esperma.

La digestión del ADN se realizó con las enzimas de restricción MspI y HpaII (enzimas esquizómeros que reconocen la secuencia 5'C/cGG3', pero que HpaII es incapaz de reconocer si "c" está metilada). La hibridación posterior se llevó a cabo con un fragmento de 0.42 kb correspondiente al promotor (-304 a +118).

Los resultados del Southern blot mostraron que existían diferencias en el perfil de metilación del promotor de MAGE-1 entre leucocitos y esperma respecto

de los puntos de restricción Hpa II (**Fig. 23 y 24**).

En esperma uno de los puntos debía de estar localizado en la posición -81, -61 o -52 del promotor, sin embargo la técnica de Southern blot no identificó que punto o puntos estaban desmetilados.

En leucocitos existía una hipermetilación (ausencia de fragmentos identificables), que en sí misma no era evidencia suficiente para concluir que ninguno de los puntos nombrados anteriormente estuviesen desmetilado, ya que la definición de un fragmento involucra dos puntos de restricción con una separación límite que determine la aparición de un fragmento detectable. En este sentido la ausencia de puntos Hpa II en ambos sentidos de las posiciones nombradas podía enmascarar la desmetilación de dichos puntos.

En las diferentes líneas tumorales analizadas el perfil de metilación del promotor fue mas o menos constante, en general se puede decir que la metilación en puntos Hpa II era menor en aquellas líneas con expresión de MAGE-1 (**fig. 23 y 24**).

Frente al estado hipermetilado de los leucocitos existía la desmetilación específica del esperma que generaba un fragmento de aproximadamente 636 pb, sin embargo fue imposible determinar que puntos estaban implicados directamente. Uno de ellos pertenecía a la triada descrita anteriormente, pero el otro punto no se pudo describir ya que existían dos dianas Hpa II equidistantes del primero.

La importancia de este fragmento radicaba en que estaba presente en todas

aquellas líneas tumorales que expresaban MAGE-1 al igual que en esperma, y estaba ausente en aquellas líneas negativas y en leucocitos.

Hay que destacar también la presencia de otros fragmentos que aparecían únicamente en las líneas tumorales independiente de la expresión o no del gen Mage-1, y que podrían corresponder al hecho de la heterogeneidad de las líneas, de forma que ésta se podría reflejar también en variabilidad en el perfil de metilación del promotor de MAGE-1. También hay que tener en cuenta que el gen MAGE-1 se localiza en el cromosoma X, en su parte no apareante, y que en aquellas líneas femeninas la inactivación de uno de los dos cromosomas podría implicar también perfil de metilación diferente, el cual se reflejaría en el análisis de Southern blot.

A pesar de la información del análisis de Southern blot, en el que se muestra un fragmento específico en las líneas MAGE-1 positivas, quedaba aún por determinar que puntos de la zona B'B estaban implicados en la regulación por metilación.

c) Estudio mediante PCR de metilación puntual (fig. 25).

Con el fin de determinar el estado metilado o no de dos puntos concretos (-61 y -52) de la secuencia promotora correspondiente a la zona B'B, se desarrolló un nuevo método, en el cual se combinó la digestión enzimática con la técnica de PCR.

La técnica básicamente consistía en interrumpir o no mediante digestión con

la enzima HpaII el "molde" que utiliza la polimerasa para la síntesis de la cadena de ADN complementaria. Esta diana enzimática coincidía con dos secuencias (5'CCGG3') ubicadas en la región promotora B'B, y que eran potenciales puntos de unión de factores transcripcionales.

Aproximadamente 100 ng de ADN de las diferentes líneas fueron digeridos con una actividad en exceso de las enzimas MspI y HpaII a 37°C durante 12 h., posteriormente las enzimas fueron inactivadas a 95°C. De forma paralela la misma cantidad de ADN se utilizó como control, sometiéndola al mismo protocolo pero sin la presencia de las enzimas de restricción.

12 ng de ADN fueron sometidos a PCR utilizando para ello un juego de tres oligonucleótidos, dos de ellos en el mismo sentido, CDS20 (-79) y CDS22 (-13) que delimitaban las dianas MspI/HpaII (-61 y -52), y un tercero antisentido EDP4 situado en el primer intrón.

Aunque las posibilidades de la secuencia B'B en cuanto a la metilación eran tres, nosotros con este método únicamente podíamos detectar dos: que los dos puntos HpaII estuviesen metilados, o que uno o los dos estuviese desmetilado.

En el primer caso la secuencia puente entre el oligonucleótido más externo (CDS20) y el más interno (CDS22) quedaría intacta, con lo cual se generarían dos amplificados, uno de 197pb (CDS20-EDP4) y otro de 131pb (CDS22-EDP4) que coincidirían con el control no digerido.

En el segundo caso, la interrupción por digestión de la secuencia puente

tendría como resultado únicamente la síntesis del amplificado de 131pb (CDS22-CDS20), que coincidiría con el resultado obtenido mediante digestión con MspI.

En este método fue fundamental que los oligonucleótidos sentido se encontraran en la misma concentración en la mezcla de reacción, ya que la presencia en exceso del oligonucleótido CDS22 podría generar falsos resultados cuando los puntos HpaII se encontrasen metilados. El amplificado CDS20-EDP4 contiene también la zona complementaria de CDS22 y una descompensación a favor de este último oligonucleótido podría generar un reamplificado CDS22-EDP4 que falseara el resultado real.

La aplicación de la técnica en las diferentes muestras mostró como primer resultado que la técnica funcionaba, ya que en todos los casos se confirmaban los resultados controles esperados.

Con esta técnica se confirmó el estado hipermetilado del promotor MAGE-1 en leucocitos, ya que los puntos -61 y -52 de la región B'B se encontraban metilados. Estos puntos aparecían también metilados en la línea HL60 negativa para la expresión de MAGE-1, mientras que en aquellas líneas positivas y en esperma uno de los puntos o ambos se encontraban desmetilados (**fig. 26**)(**tabla 2**).

2. ESTUDIO DE FACTORES TRANSCRIPCIONALES.

Este estudio se realizó mediante ensayos de movilidad en geles de retardo. Las líneas escogidas fueron, como líneas MAGE-1 positivas K562 y COLO668, y como línea negativa HL60.

Se utilizaron como sondas, el oligonucleótido de doble cadena correspondiente a la región B' y el mismo oligonucleótido metilado en la posición -60 correspondiente al promotor (**tabla 3**).

Los resultados obtenidos con la sonda metilada fueron contundentes, ya que la interacción ADN-proteína fue prácticamente inhibida. Sin embargo la sonda nativa desmetilada retenía dos complejos en las líneas K562 y HL60.

Los ensayos controles de competitividad demostraron la especificidad de la sonda B' para retener los diferentes complejos, y de igual manera apoyaban la idea de que la interacción entre la sonda metilada y los factores proteicos era débil (**fig. 27**).

3. ESTUDIO FUNCIONAL DEL PROMOTOR (REGION B'B).

El análisis del promotor Mage-1 se completó con un estudio funcional de la zona B'B. Este se realizó de forma indirecta mediante la expresión del gen de la enzima luciferasa, el cual se encontraba bajo el control de la zona promotora B'B.

El plásmido pXP1 (Nordeen 1988) portador del gen de la luciferasa fue utilizado como vehículo para transportar esta región promotora en experiencias de transfección transitoria.

La región B'B fue subclonada mediante PCR a partir del plásmido PTZ1.900 que portaba el promotor completo y utilizando los oligonucleótidos CDS20 y 1427. El inserto previa digestión con la enzima Sall fue clonado en el sitio SmaI/Sall del plásmido pXP1, el resultado fue el plásmido pMAGE-1luc80().

La eficacia transcripcional de la región B'B de Mage-1 se evaluó midiendo la actividad luciferasa presente en las células transfectadas con el plásmido pMAGE-1luc80.

Nosotros hemos utilizado la electroporación como método de transfección. 14 horas después de la transfección las células fueron recolectadas y lisadas con tampón lisis, el sobrenadante del lisado fue recolectado. La actividad luciferasa fue medida en luminómetro. Este enzima es capaz, en presencia de ATP, de transformar la luciferina en oxiluciferina, esta reacción está acompañada de una emisión de luz que puede ser medida.

De forma paralela a la transfección del plásmido pMAGE-1luc80, las células fueron transfectadas con el plásmido pSV2luc, el cual tenía el gen de la luciferasa bajo el control del promotor del virus SV40. Como los factores de transcripción que modulan la actividad de este promotor son ubicuos, se puede pensar que la eficacia del promotor SV40 es bastante parecida en todas las líneas estudiadas.

Los niveles de transcripción inducidos por el promotor del gen MAGE-1 fueron expresados en porcentaje de la actividad luciferasa inducida en el plásmido pMAGE-1luc80, en relación con la actividad luciferasa inducida en el plásmido pSV2luc en la misma línea celular.

Las condiciones experimentales (transfección, recolección y lisis celular), podían variar la actividad luciferasa en las diferentes muestras. Para normalizar los resultados, cotrasfectamos cada vez el plásmido pSV- β -galactosidasa, que contenía el gen de la β -galactosidasa bajo el control del promotor SV40. Esta enzima cataliza la hidrólisis del o-nitrophenil β -D-galactopiranosido (ONPG) en o-nitrofenol, cuya acumulación puede ser medida en espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm.

Las experiencias de transfección transitoria se realizaron en las diferentes líneas descritas. Los resultados mostraron que existía una relación directa entre la actividad transcripcional de la región B'B y la transcripción real del gen, medida mediante RT-PCR (**fig. 28**).

Existían dos líneas celulares (LB23 y LB37) en las cuales no se encontró

dicha relación, únicamente se alcanzaba la correlación cuando se las sometió a protocolo de desmetilación. Para descartar que la desmetilación pudiese tener un efecto trans-modulador, la línea LB23 se sometió a protocolo de desmetilación y posteriormente se midió la actividad transcripcional de la región B'B. Los resultados indicaban que la actividad transcripcional permaneció inalterada, lo que indicaba el efecto cis-modulador de la metilación.

Nombre	Expresión basal MAGE-1	Tratamiento DAC
LB37	+/-	++
LB23	-	+
HL60	-	.

Tabla 2. Inducción de la expresión de MAGE-1 en líneas tumorales tras exposición al agente 5-Aza-2'-deoxicitidina.

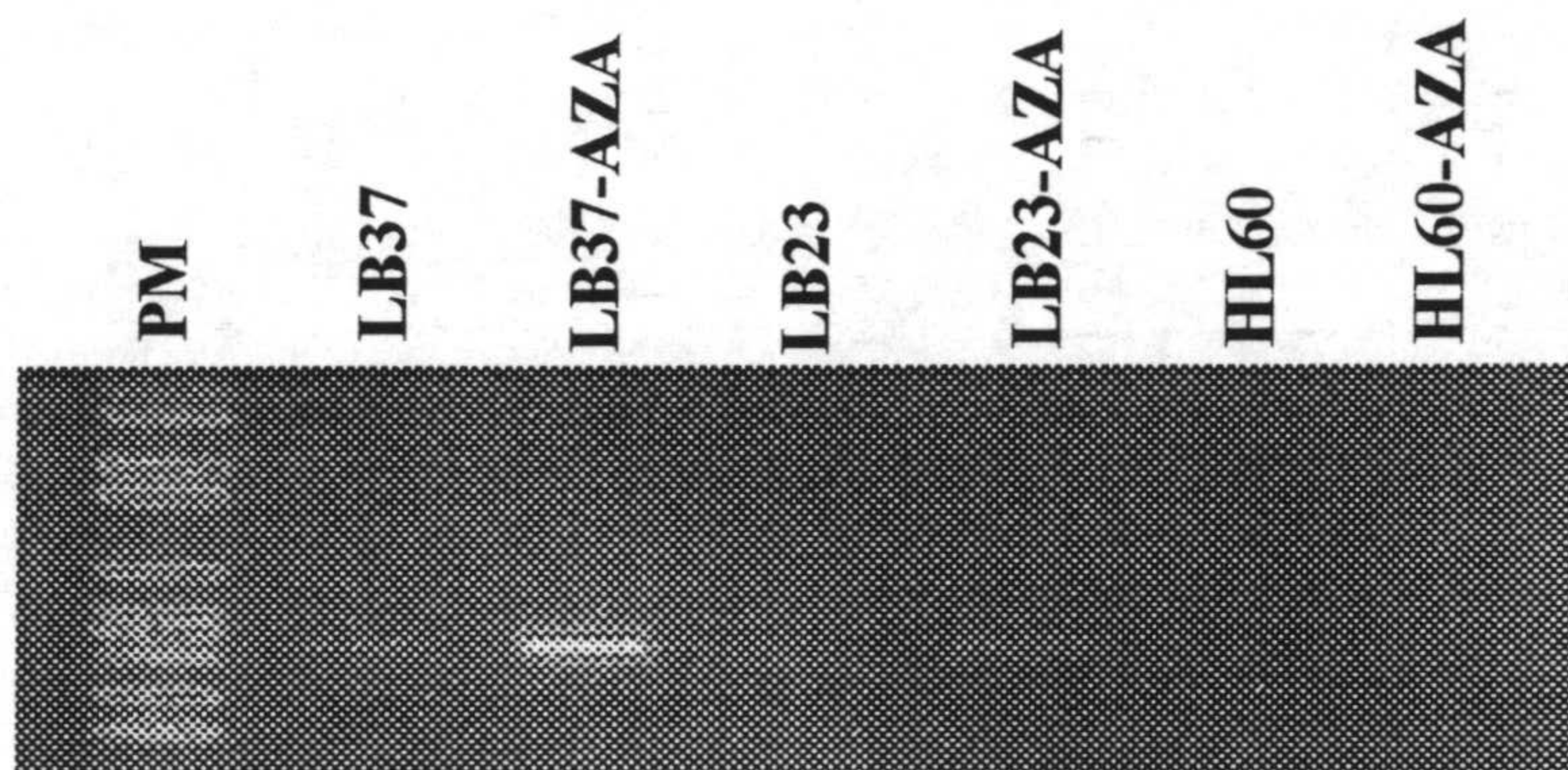


Fig. 21. Reexpresión del gen Mage-1 en diferentes líneas con expresión basal negativa (LB23 y HL60), o con poca expresión (LB37). La expresión del antígeno se recupera en la línea LB23 y aumenta en la línea LB37, pero no se recupera en la línea HL60.

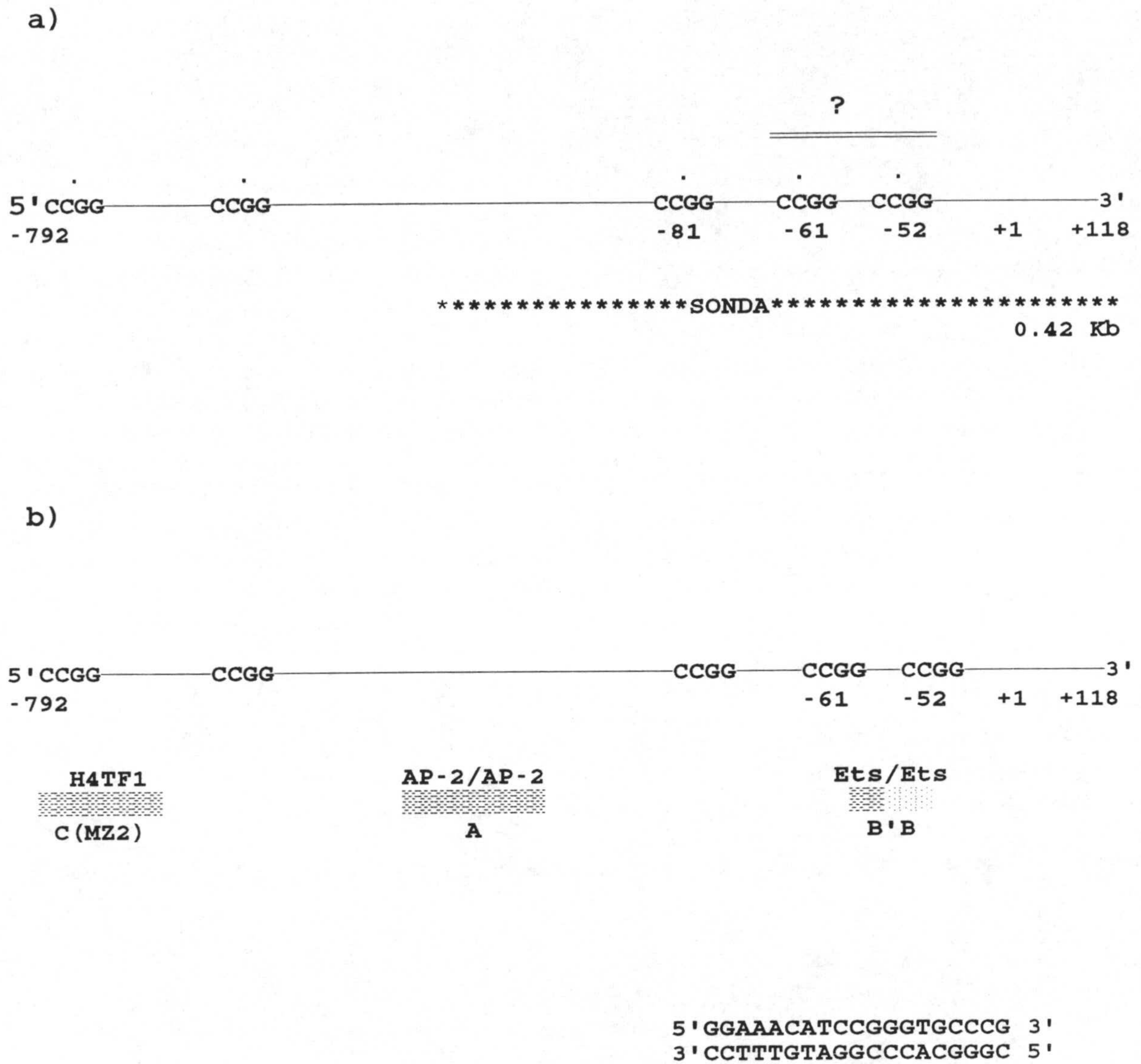


Fig. 22. Esquema del promotor del gen Mage-1, en el que se muestran los puntos de corte Hpa II, dos de los cuales pueden estar implicados en la regulación del gen por metilación. a) Tamaño de sonda utilizada en las experiencias de Southern blot. b) Distintas regiones descritas como moduladoras y posibles factores transcripcionales de unión, igualmente se muestra la sonda B' utilizada en las experiencias de movilidad en geles de retardo.

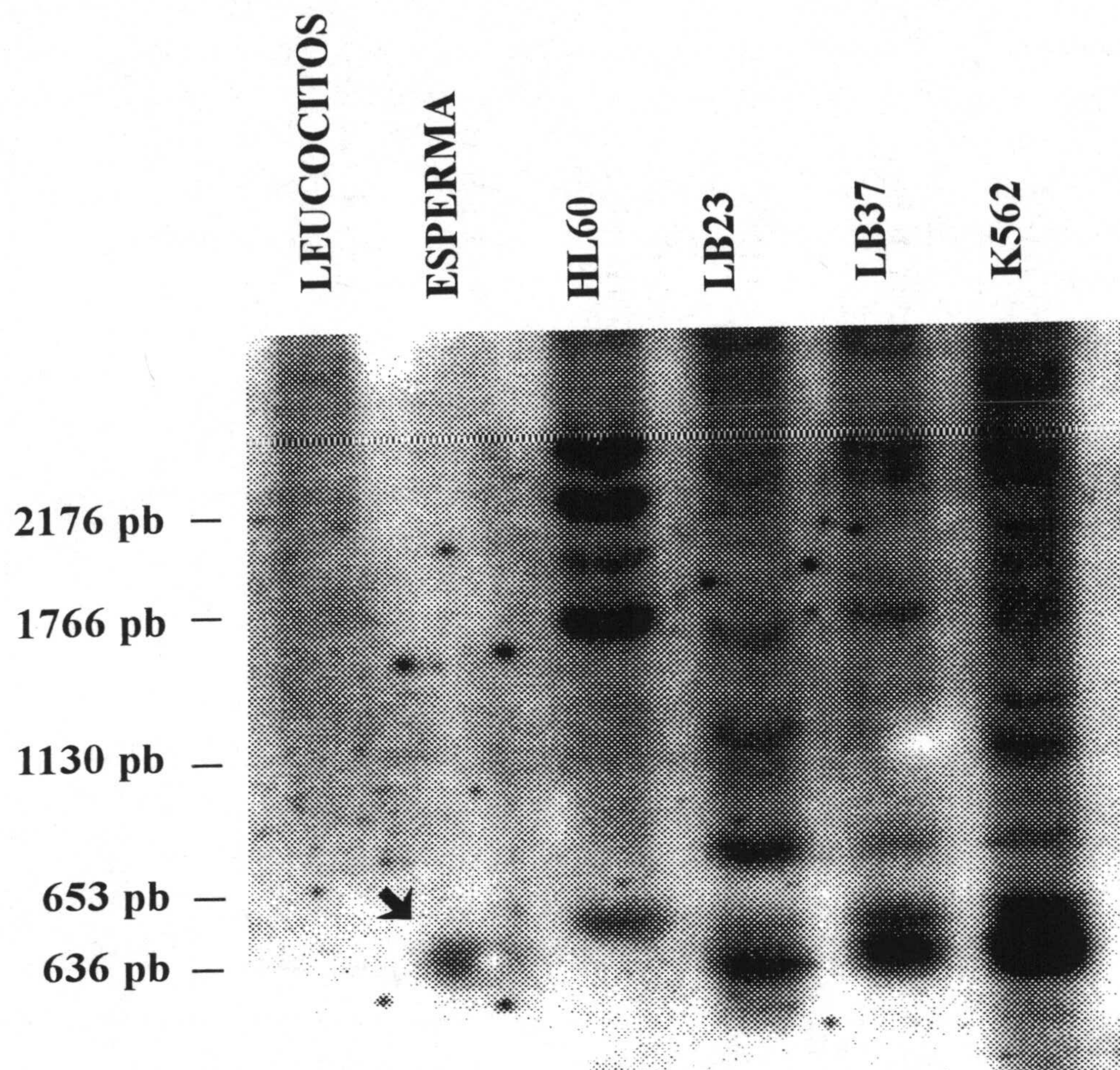


Fig. 23. Southern blot 1. Se digirió el ADN de las diferentes líneas, así como el de las muestras normales, con la enzima Hpa II. La sonda utilizada tenía un tamaño de 0.42 kb. En el southern blot se observa una ausencia prácticamente total de bandas en leucocitos. En esperma aparece una banda de aproximadamente 636 pb, que aparece también en otras líneas. La línea HL60 presenta un perfil de metilación mayor, respecto a los puntos Hpa II. En general, todas las líneas tumorales presentan un perfil de metilación heterogéneo, en comparación con los leucocitos y el esperma

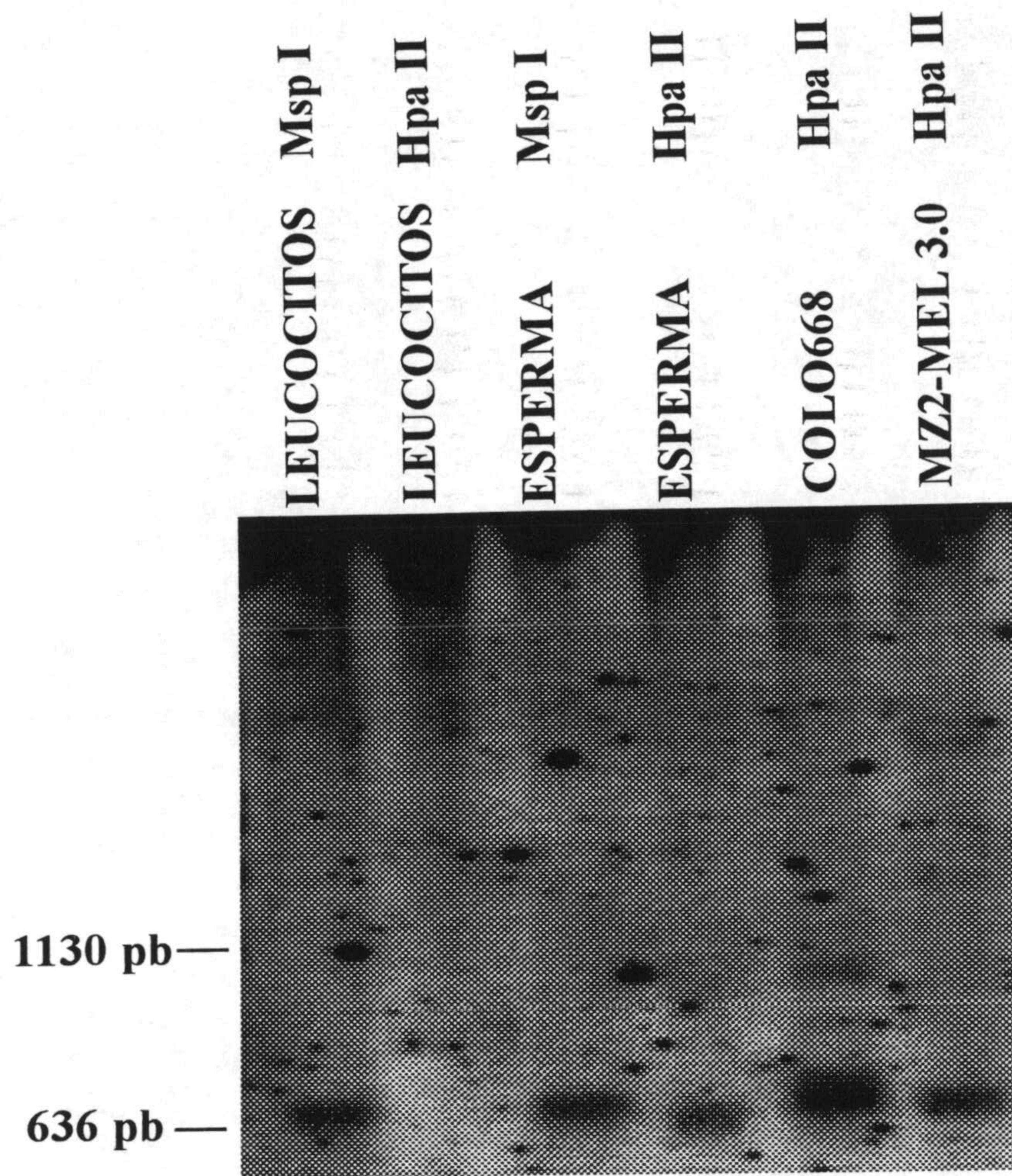
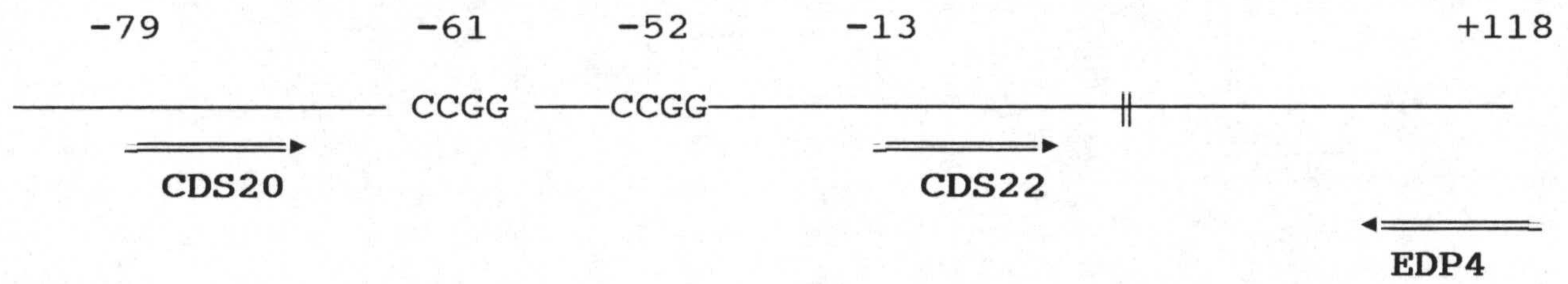
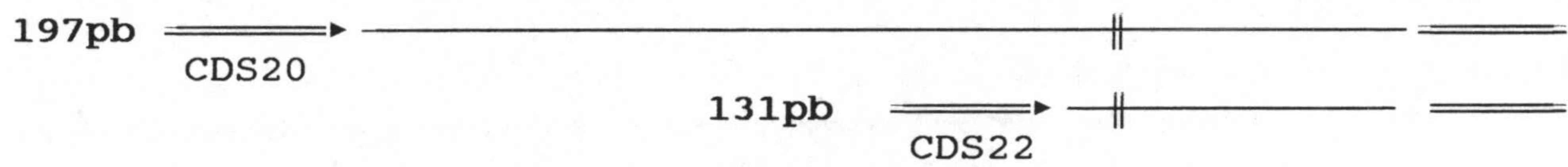


Fig. 24. Southern blot 2. Control de digestión enzimática de leucocitos y esperma. Ambos fueron digeridos con las enzimas Msp I y Hpa II. Se observa que los dos responden a la digestión con la enzima Msp I, pero solamente el esperma muestra la banda de 636 pb cuando se digiere con Hpa II. Igualmente se muestra el resultado de dos líneas positivas para la expresión de MAGE-1, cuando se digieren con Hpa II. Las dos líneas tumorales presentan un bajo nivel de metilación respecto a Hpa II, que contrasta con otras líneas estudiadas, siendo además el perfil de metilación muy homogéneo.

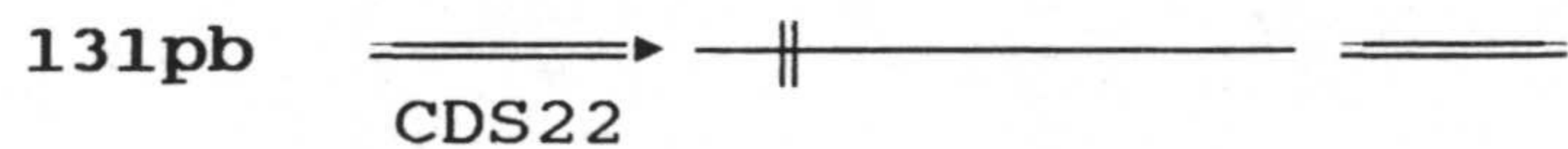


Amplificación de ADN control: ADN + CDS20 + CDS22 + EDP4.



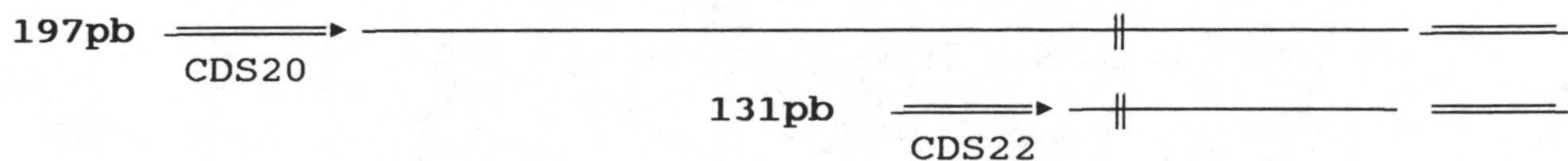
Amplificación de ADN digerido.

- ADN digerido con la enzima MspI: ADN(Msp I) + CDS20 + CDS22 + EDP4.



- ADN digerido con la enzima HpaII: ADN(Hpa II) + CDS20 + CDS22 + EDP4.

a). Que las dos dianas estén metiladas ($\overline{C}C^MGG/\overline{C}C^MGG$).



b). Que una o ambas dianas estén desmetiladas ($\overline{C}C^MGG/CCGG$) ($CCGG/CCGG$).

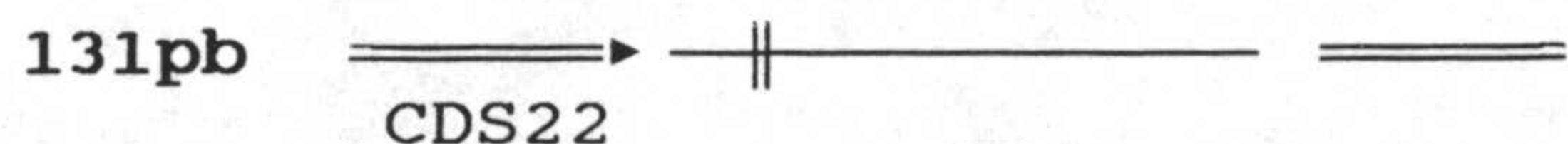


Fig. 25. Determinación de metilación puntual mediante digestión enzimática y PCR.

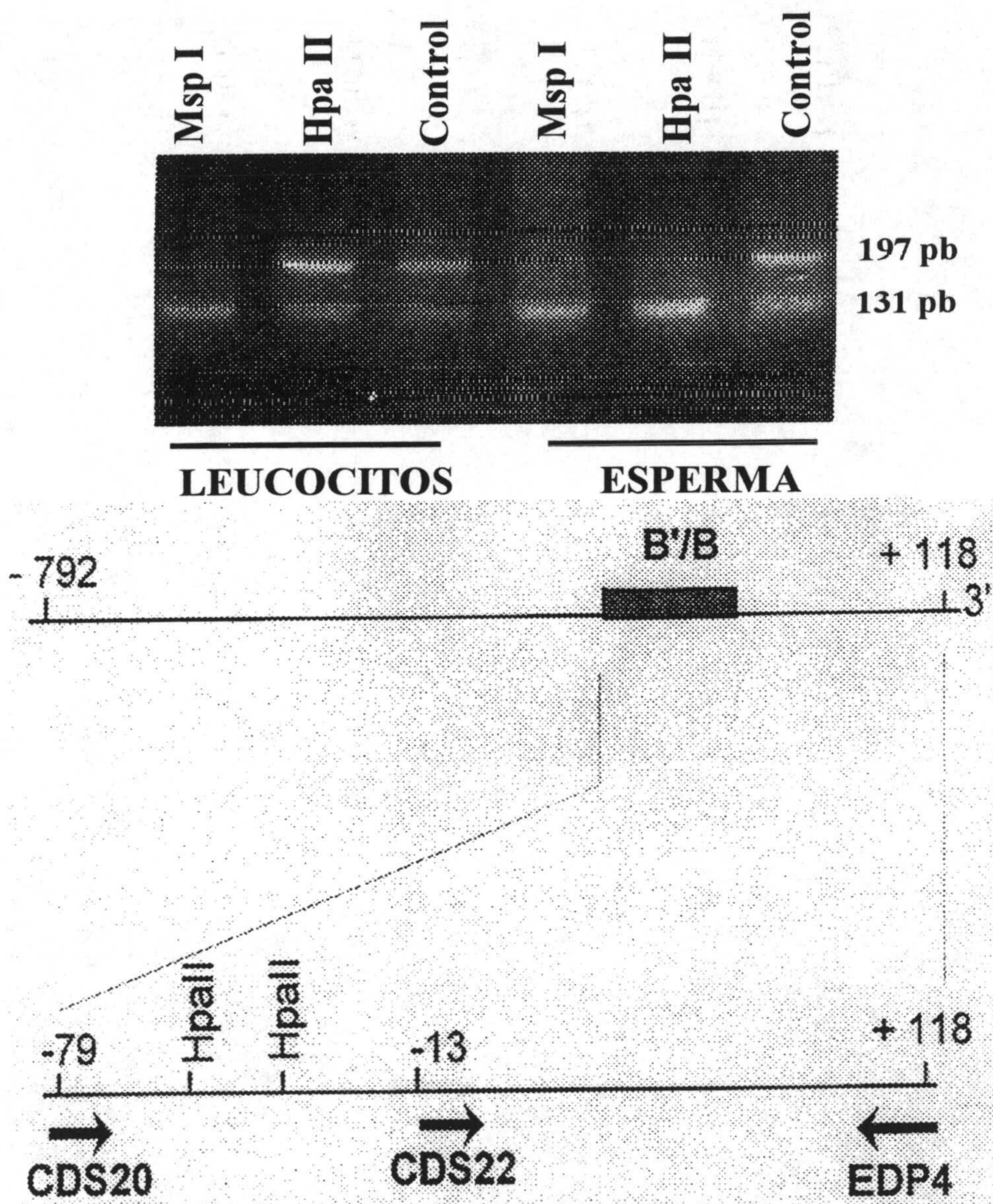


Fig. 26. Resultado del estudio de metilacion puntual mediante digestión enzimática y PCR. Mientras que en leucocitos los dos puntos, señalados en el esquema como Hpa II, se encuentran metilados; en esperma, uno de ellos o ambos está desmetilado. El esquema muestra la situación de los primers utilizados en la PCR, y la situación de los puntos sucesptibles de metilación.

Células y líneas celulares	Estado de metilación de B'B
Leucocitos	+
HL60	+
esperma	-
K562	-
LB23	-
LB37	-
COLO668	-

Tabla 2. Estudio de metilación realizado en sitios de restricción Msp I/Hpa II de la región B'B del promotor de Mage-1. (+) ambas dianas se encuentran metiladas. (-) una de las dianas, o las dos están desmetilada.

B'	CGGGCACCCGGATGTTTCCTGGC GTAGGCCCGTGGGCCTACAAAGG
B' m	CGGGCACCCGGATGTTTCCTGGC GCCCGTGGGCCTACAAAGGACCG
OCT-1	GATCCATGCAAATCATGCAAATCATGCAAATCA GTACGTTTAGTACGTTTAGTACGTTTAGTCTAG

Tabla 3. Oligonucleótidos usados en los ensayos de movilidad en geles de retardo. B' y B' m, muestran la secuencia de unión a los factores Ets. Oct-1, se utilizó en los ensayos controles.

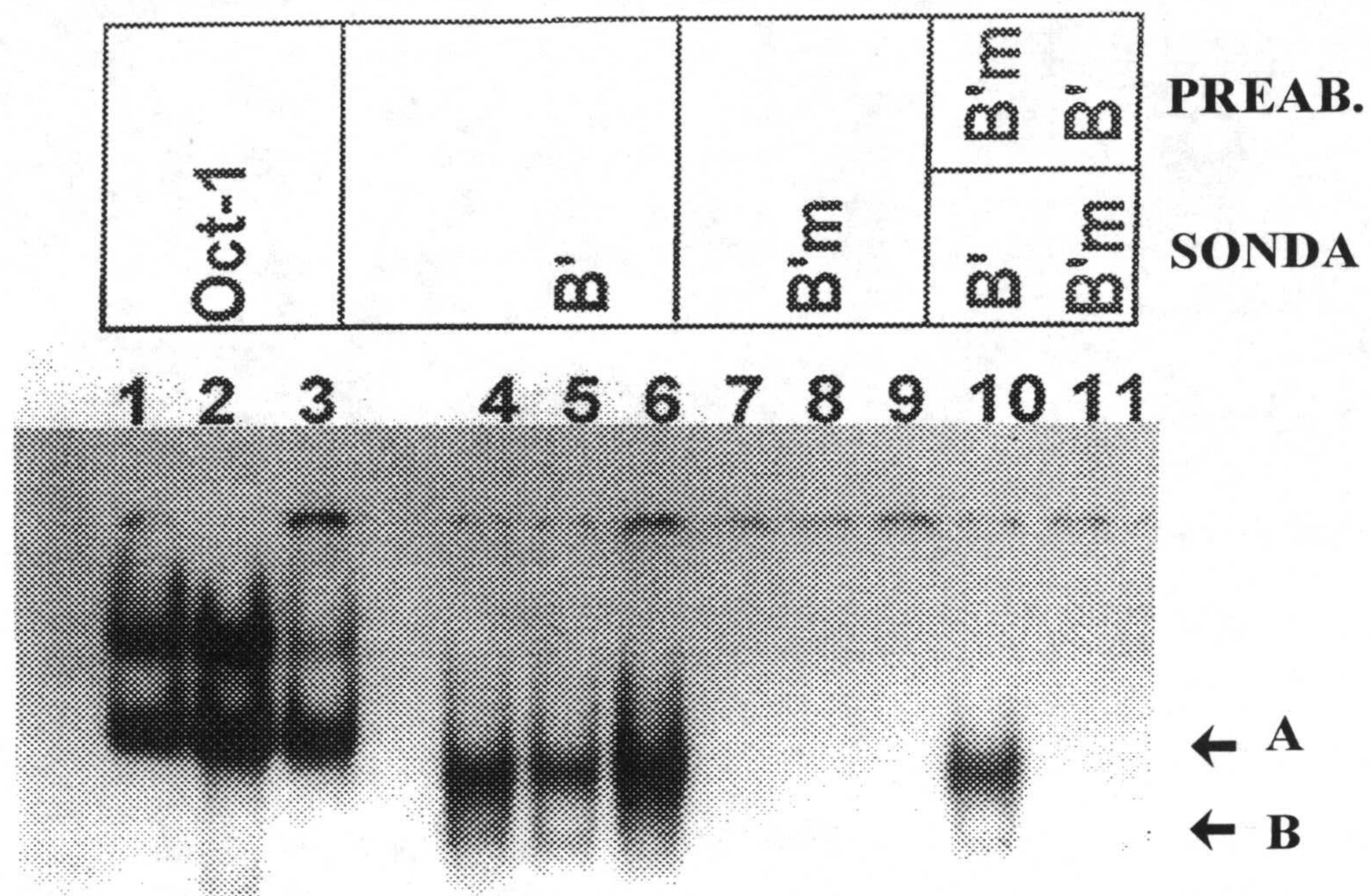
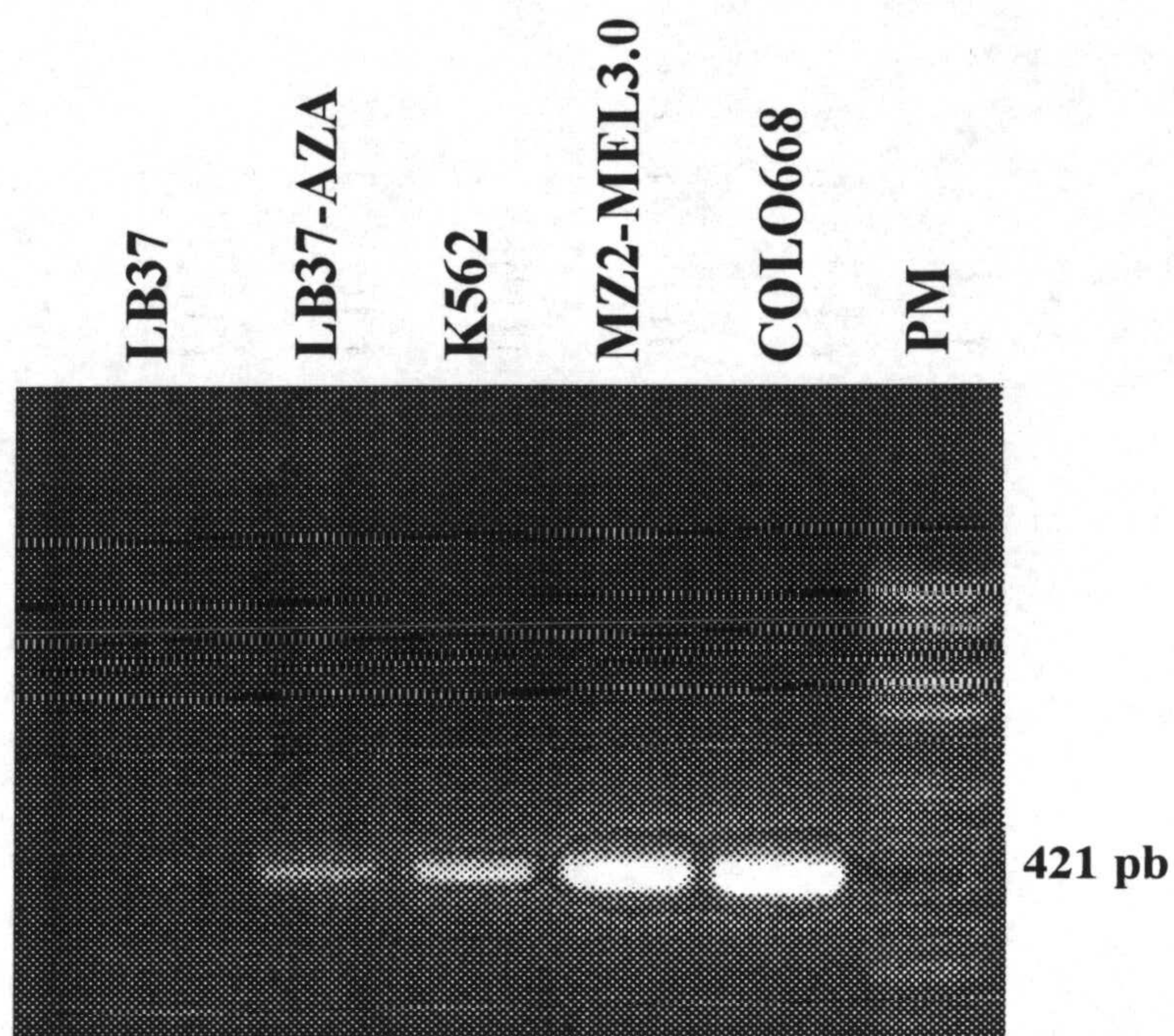


Fig. 27. Ensayo de movilidad en gel de retardo. El ensayo se llevó a cabo con las líneas K562 (1, 4, 7, 10 y 11), HL60 (2, 5 y 8) y COLO668 (3, 6 y 9). Las líneas K562 y HL60, retenían dos complejos (A y B) cuando se utilizó la sonda B' no metilada, sin embargo la línea COLO668 retenía un único complejo (A). La sonda metilada B'm inhibía totalmente la unión de factores nucleares en todas las líneas. La preabsorción previa con la sonda B'm no impidió la captación de extractos nucleares por la sonda B' (10), lo que reafirmaba la incapacidad de la sonda metilada para unirse a factores nucleares.



ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL RELATIVA

LB37	LB37-AZA	K562	MZ2-MEL3.0	COLO668
25	25	30	45	90

Fig. 28. Actividad transcripcional del gen Mage-1 en diferentes líneas tumorales. En el gel se muestra la actividad transcripcional de las diferentes líneas, medida mediante RT-PCR. En la tabla se expresan los porcentajes de actividad transcripcional de la región promotora B'B en las mismas líneas. Se observa una correlación entre la actividad transcripcional total del promotor de Mage-1 y la actividad transcripcional relativa B'B.

DISCUSSION

El gen Mage-1 codifica para dos antígenos tumorales descritos hasta el momento y que son resultado de la expresión anormal del gen en diferentes tumores. Este gen que sufre un proceso de reactivación, se encuentra de forma inalterada en las células tumorales al igual que en el resto de las células no tumorales, de hecho, el gen se expresa en condiciones fisiológicas en tejido testicular (Van der Bruggen y col. 1991, 1994; De Smet y col. 1994).

Es indudable que la importancia del gen Mage-1 radica en la capacidad de codificar para antígenos tumorales que son reconocidos por CTLs autólogos, sin embargo la importancia va más allá de las puras consideraciones clínicas e incide en el descubrimiento de un nuevo gen, del que se desconocía tanto su regulación génica como las características de la proteína que codifica.

Los primeros estudios teóricos de la proteína revelaron que su secuencia carecía de péptido señal y que poseía un posible dominio transmembrana, que debido a su reducido tamaño podría funcionar sólo en asociación con el dominio transmembrana de otra(s) proteína(s). El análisis de secuencia reveló también que únicamente existía una moderada homología con la proteína murina Necdina cuyo dominio transmembrana, curiosamente, se encontraba perfectamente conservado (De Plaen y col. 1994).

Nuestro trabajo con la proteína recombinante MAGE-1 mostró su baja estabilidad en el protoplasma bacteriano, ya que era rápidamente degradada, lo que hizo necesario modificar las condiciones de cultivo (**fig. 5**). Estos resultados, que

coincidían con los obtenidos por otros grupos de investigación (Chen y col. 1994), daban una idea de lo peculiar de la proteína, la cual después de sus síntesis podría adoptar conformaciones altamente inestables. Queremos con esto, incidir en la necesidad de que la proteína MAGE-1 en condiciones fisiológicas deba de estar asociada a otra(s) proteína(s) para mantener su integridad.

El hecho de que MAGE-1 tenga un dominio transmembrana altamente conservado, hace pensar en su asociación con dominios hidrófobos de otras proteínas. Esta idea se reforzó en experiencias realizadas en sistemas de expresión eucariota, ya que cuando las fracciones hidrosolubles y liposolubles (membranas y proteínas asociadas) se separaron, la proteína recombinante MAGE-1 siempre quedaba en la fracción liposoluble (**fig. 13**). Estos indicios sugieren que MAGE-1, a pesar de ser una proteína citoplasmática, debe de encontrarse asociada a otras proteínas formando complejos más o menos estables. En este sentido, la proteína MAGE-1 ha sido últimamente descrita, mediante Acs monoclonales específicos y en líneas de melanoma, como una proteína citoplasmática que forma parte de un "orgánulo" paranuclear con cierta similitud con el Retículo Endoplasmático (Costesec y col. 1994; Thates y col. 1994).

La obtención de varios antisueros anti-MAGE-1 y la localización celular de la proteína fue uno de los primeros objetivos proyectados en este trabajo. Las dos diferentes especies de antisueros eran capaces de reconocer la proteína recombinante, sin embargo los resultado de los antisueros en el reconocimiento de la proteína

nativa fueron muy variable. Los antisueros parecían únicamente reconocer la proteína nativa en ciertos cortes histológicos, siendo los resultados negativos cuando se utilizaron extractos celulares, tanto en condiciones desnaturalizantes como no desnaturalizantes. ¿Eran estos resultados consecuencia de la configuración o estado de la proteína nativa?. Efectivamente, como se dijo anteriormente, todos los indicios sugieren que la proteína se encuentra acomplejada con otras proteínas, lo que implicaría una configuración diferente a la que podría tener en condiciones aisladas, y por tanto una presentación de epítopos diferentes o bien la ausencia total de epítopos. Posiblemente algunos de los tratamientos a los que eran sometidos los tejidos hasta su puesta en contacto con el antisuero podían poner de manifiesto algunos epítopos ocultos. Sin embargo la no unificación de resultados hizo pensar en la reactividad como artefactos de la técnica.

Hasta el momento no se reconoce como válido ningún antisuero o anticuerpo monoclonal que sea capaz de reconocer la proteína nativa MAGE-1 en cortes histológicos. Todos los antisueros y Acs monoclonales producidos hasta el momento en los diferentes laboratorios tienen un patrón de reactividad heterogéneo, todos bajo el denominador común de que reconocen la proteína en células que han sido previamente tratadas, lo que sugiere una modificación de la proteína nativa que determina la accesibilidad de los anticuerpos y su reconocimiento.

Hay que resaltar que nuestros resultados en cortes histológicos, a pesar de lo variables, coincidían en reconocer como positivos en la expresión del antígeno

MAGE-1, aquellos tipos de tejidos, tumorales o no, que habían sido descritos como positivos por la técnica de RT-PCR (**tabla 1**). Además la expresión en la extensión histológica era heterogénea, es decir, en los tejidos tumorales la expresión quedaba relegada a un número determinado de células (**fig. 9**), mientras que en secciones de testículo la expresión se localizaba en el epitelio germinal, concretamente en las capas más externas y menos diferenciadas, de los tubos seminíferos (**fig. 8a**).

La confirmación de la heterogeneidad de expresión del antígeno MAGE-1 en tejidos tumorales puede tener relevancia, y habría que tenerla en cuenta a la hora de valorar la terapia inmunológica frente a aquellos tumores MAGE-1 positivos.

El descubrimiento del antígeno MAGE-1 en células tumorales, y más concretamente el hecho de que fuese resultado de la reexpresión de un gen que se mantenía silente en la gran mayoría de los tejidos, hizo pensar, además de en las posibles características de la proteína, en las implicaciones que podría tener durante el desarrollo tumoral en aquellos tumores que lo expresaban. En este aspecto, nuestros estudios apoyarían la idea de la expresión del antígeno MAGE-1 como un epifenómeno, resultado de la propia dinámica tumorogénica.

Nuestros resultados obtenidos con las variantes A y B de la línea K562, mostraron que la expresión de MAGE-1 no era necesaria para mantener un fenotipo transformado. El hecho de que ambas variantes sean la misma línea (**fig. 15 y 16**) y que difieran en la expresión del antígeno MAGE-1 (**fig. 14**), incide en la idea de

que su expresión no es clave en el mantenimiento del estado transformado, y que su reactivación sería consecuencia de los fenómenos que acompañan a la transformación, o bien, en este caso de la propia adaptación de la línea a cultivo. En cualquiera de los casos la expresión podía ser catalogada de epifenómeno.

Se ha propuesto que el gen Mage-1 se expresaría en condiciones normales durante etapas tempranas del desarrollo embrionario, para después quedar silente en la mayoría de los tejidos adultos (Pardoll y col. 1993). La inactivación del gen debería de ocurrir tempranamente en la embriogénesis, ya que el reconocimiento de la proteína MAGE-1 como antígeno implica que ésta no ha sido reconocida como propia, y por tanto inmunológicamente no ha sido tolerada durante la maduración del sistema inmune. Se podría entonces afirmar que la proteína MAGE-1 sería propia de células indiferenciadas o en proceso de diferenciación, lo que explicaría también por que ciertos tumores la expresan, si se tiene en cuenta que las células tumorales pierden gran parte del carácter de diferenciación que caracteriza al tejido del cual proceden.

Nuestros resultados, utilizando como modelo la línea K562 en sus dos variantes, muestran que la proteína MAGE-1 puede estar presente en células diferenciadas, que además han perdido la capacidad de dividirse de forma ilimitada, capacidad que define a las células tumorales. Efectivamente la línea K562B mostraba una mayor diferenciación que su semejante K562A (**fig. 17**), siendo además negativa para la expresión de la proteína MAGE-1. Para el estudio de diferenciación, además

de las características morfológicas, se utilizó como referente el perfil de expresión de un grupo de marcadores de diferenciación mielo-eritroide de superficie. Estos marcadores eran: CD45, GP-A, CD13, CD33, CD15, CD61, CD11b y CD71. Mediante diferentes moduladores químicos se logró mantener la línea K562A en un estado de diferenciación eritroide muy similar al de la variante K562B, sin embargo se seguía manteniendo la expresión del gen Mage-1 (**fig. 19**). Se utilizaron dos agentes químicos que diferenciaban la línea K562A hacia un linaje eritroide, Hemina y Ara-C, ambos inducían un aumento significativo en los marcadores CD45, GP-A, CD13 y CD33 (**fig. 18**). Sin embargo Ara-C producía un stop proliferativo (**fig. 19**) que no producía la Hemina. Idénticos resultados, respecto a la expresión de Mage-1, se obtuvieron con el agente PMA que producía diferenciación monocítica, la cual se caracterizaba por un aumento de los marcadores CD45, CD13, CD33 y CD11b, una mayor adhesión al plástico, y una transformación morfológica característica de células macrofágicas. Al igual que el modulador Ara-C, el PMA producía un stop proliferativo. Estaba claro, pues, que la proteína MAGE-1 era compatible con un estado diferenciado, ya que no interfería en el proceso; también quedó claro que las células en Go eran capaces de expresar el antígeno, o sea, el antígeno MAGE-1 era compatible con un estado de total diferenciación.

Actualmente la presencia del antígeno MAGE-1, al igual que la de otros miembros de la familia, está siendo utilizada para generar terapias efectivas

antitumorales. MAGE-1 se expresa de forma desigual en tumores de origen histológico diverso, la reactivación o el aumento de expresión de forma dirigida podría ampliar el número de tumores con expresión antigénica y por tanto posibles objetivos de una terapia antitumoral.

El estudio de la regulación del gen Mage-1 resulta fundamental, no sólo por su valor intrínseco, sino además porque el conocimiento de los factores implicados puede ser importante para una reexpresión dirigida del antígeno MAGE-1.

Como ya se ha repetido a lo largo de este trabajo el gen Mage-1 consta de tres exones, localizándose la fase abierta de lectura en el exón tres. Es precisamente este exón el que muestra un mayor porcentaje de identidad con el resto de la familia MAGE, sin embargo frente a esta identidad se opone una alta variabilidad cuando se compara el extremo 5' de todos ellos. Se ha sugerido que la familia MAGE pudiese ser resultado de sucesivas duplicaciones de un gen primigenio, a lo largo de la evolución, que han conseguido genes con una misma función bajo diferentes controles de transcripción. Todo esto ha podido desembocar en una expresión de los diferentes genes, temporal y regional, muy específica (De Plaen y col. 1994).

La región del gen Mage-1 entre -792 y +118 fue la zona que presentó una actividad transcripcional óptima, y por tanto ha sido definida como el promotor del gen Mage-1 (De Smet y col. 1995)

El promotor del gen Mage-1 contiene al menos cinco regiones activadoras, pero su actividad parece estar principalmente dirigida por un motivo de unión a

factores Ets contenido en la región B (**fig. 22**). Aunque esta región supone el 50% de la actividad transcripcional, existen otras dos regiones que tienen un papel menos fundamental en la actividad del promotor. Mientras que la región C situada entre -792 y -714 supone un 25% de la actividad transcripcional, la región A, -146 a -91, constituye el 20%. La actividad de este promotor, no es, sin embargo, el resultado de las actividades independientes de sus regiones, ya que se encontró un sinergismo entre algunas de éstas. La región B' que forma un tándem con la región B, y que tiene un motivo invertido de unión a factores Ets, está funcionalmente ligada a la región A; siendo esta dependencia recíproca. De igual forma la región D actúa duplicando la actividad de la región B (De Smet y col. 1995).

El estudio completo del promotor se realizó en la línea de melanoma MZ2-MEL, existía, por tanto, el problema de generalizar las conclusiones obtenidas sobre otras líneas de origen histológico diferente y que también expresaban el antígeno MAGE-1. Quedaba también por determinar la implicación concreta de la metilación en la regulación transcripcional, que se había sugerido que podía estar directamente implicada (Weber y col. 1994).

En el estudio del promotor, nosotros hemos mostrado que la represión transcripcional del promotor no sólo está controlada por la ausencia de factores transcripcionales. De hecho, aunque la actividad promotora de la región B'B se correlacionaba con la intensidad de la expresión de la proteína MAGE-1 en algunas líneas, también se detectó actividad transcripcional en células que no la expresaban

(fig. 28). Además, en ensayos de movilidad en geles de retardo, se observó que a estas secuencias se unían complejos nucleares tanto en líneas positivas como negativas para el antígeno MAGE-1. Estos resultados habían sido ya observados en fibroblastos normales (De Smet y col. 1995).

En nuestros estudios la metilación del ADN parece ser el principal mecanismo para controlar la expresión de MAGE-1 en presencia de factores transcripcionales Ets.

Los factores Ets han sido ampliamente implicados en la regulación de la expresión genética durante una gran variedad de procesos biológicos, que van desde la diferenciación linfocitaria (maduración y activación de linfocitos T) a los programas de desarrollo de muchos organismos. Además se los ha implicado en procesos tan generales como la replicación del ADN, o la propia transcripción basal cuando existe una secuencia iniciadora, en vez de un sitio de reconocimiento TATA (Wasylyc y col. 1993).

Si se tiene en cuenta la ubicuidad de los factores Ets, así como la gran variedad de procesos biológicos en los que intervienen, y el hecho de que el gen Mage-1 tiene un expresión bastante restringida, cabe pensar que la metilación del promotor tendría un papel fundamental en mantener el gen silente en aquellos tejidos en los que no se expresa.

Diversos factores sugieren que la metilación de la región B'B impide la expresión del gen Mage-1:

- 1) El promotor de MAGE-1 está hipermetilado en leucocitos, al igual que en otro tipo de células con expresión negativa del antígeno.
- 2) Las células que no expresan el antígeno están completamente metiladas en los dos dinucleótidos CpG de la región B'B, en contraste con las células que expresan el antígeno.
- 3) La sustitución de la Citosina por metilCitosina del dinucleótido CpG interfería con la unión de los factores ETS a la región B'B. Estas interferencias han sido recientemente demostradas mediante ensayos de unión de proteínas Ets, que era drásticamente inhibida por la presencia de grupos metilo en su secuencia de reconocimiento (Gaston y col. 1995).
- 4) El tratamiento con el agente 5-AZA-2'-deoxicitidina (DAC), reactivó o aumentó el nivel de expresión de MAGE-1 en algunas líneas tumorales.

La implicación de la metilación se determinó en principio mediante la técnica de Southern blot. En este estudio resultó evidente la diferencia entre las diferentes líneas celulares utilizadas, las células leucocitarias normales y los espermatozoides.

En este sentido en las líneas tumorales aparecían siempre un mayor número de fragmentos, independientemente de la expresión del gen Mage-1 (**fig. 23**). Esto incidiría en el hecho de que las líneas celulares durante el cultivo evolucionarían hacia una heterogeneidad que podría reflejarse también en el perfil de metilación. Al respecto, hay evidencias de que tanto el nivel como el patrón de metilación

pueden cambiar en el cultivo celular (Shmookler-Reis y Goldstein 1982; Wilson y Jones 1983)

No sólo el perfil de metilación variaba de unas líneas tumorales a otras, sino que además era evidente que mientras en leucocitos, negativos en la expresión de MAGE-1, el promotor se encontraba hipermetilado; en aquellas líneas que también eran negativas mostraban un perfil desmetilado, pero siempre con un nivel de metilación superior al encontrado en aquellas otras que expresaban MAGE-1, así como en esperma(fig. 23 y 24).

Esto apuntaba a que eran unos puntos concretos los que estaban implicados en la regulación por metilación del promotor MAGE-1, y que esta desmetilación podría ser resultado de la propia tumorigénesis. Este proceso de desmetilación ha sido ampliamente descrito y aunque no constituye un evento universal, generalmente se ha observado un decrecimiento en los niveles de metilación del ADN en una gran variedad de tumores humanos analizados (Jones y col. 1990; Laird y col. 1994).

Desde este punto de vista cabría preguntarse si la expresión del antígeno MAGE-1 tendría su inicio en una desmetilación al azar del promotor, que incidiera en ciertos puntos claves, los cuales estarían localizados en la región B'B del promotor. Esta hipótesis catalogaría también la expresión de MAGE-1 en células tumorales como un epifenómeno.

Para determinar la implicación de estos puntos en la regulación del gen Mage-1, nosotros desarrollamos una nueva técnica que combinaba la digestión

enzimática con la técnica de la PCR (**fig. 25**) . Los resultados indicaban que ambos puntos se encontraban metilados en leucocitos, así como en las línea HL60 (negativa en la expresión del gen Mage-1), mientras que existía una desmetilación total o parcial en aquellas líneas positivas y en esperma(**fig. 26**)(**tabla 3**).

Los ensayos de movilidad en geles de retardo fueron determinantes, ya que la metilación de los dos puntos inhibió de forma drástica la interacción de factores nucleares (**fig. 27**), que habían sido ya identificados como factores del tipo Ets (De Smet y col. 1995). Estos resultados apoyaban la idea de que los factores Ets se inhibían drásticamente por metilación (Gaston y col. 1995); y eran de gran importancia, en el sentido de que la metilación no afecta por igual a la interacción de todos los factores transcripcionales, existiendo muchos factores que resultan insensibles, como es el caso del factor Sp1 (Jones y Buckley 1990). Esto justificaría la metilación del promotor de Mage-1 y concretamente de la región B'B, en aquellas células que no están "programadas" para expresar la proteína MAGE-1.

El tratamiento, con DAC, de diferentes líneas negativas o con baja expresión de MAGE-1, dio como resultado la recuperación de la expresión en la línea LB23, un aumento de expresión en línea LB37, y la no recuperación en la línea HL60 (**tabla 2**)(**fig. 21**). Esto apoyaba la idea de la metilación como un elemento importante en la regulación del gen, sin embargo la presencia de los factores transcripcionales adecuados era en último término la responsable de la transcripción genética.

De esta experiencia, llamaba la atención el hecho de que una de las líneas aumentara la expresión posteriormente a su desmetilación. El aumento de expresión implicaría que la metilación afecta parcialmente a la transcripción del gen, se podría pensar entonces que uno de los dos puntos de la región B'B estaría metilado y que tras la desmetilación la región quedaría, de esta forma, totalmente abierta.

Las experiencias funcionales, en las que se utilizó la región B'B del promotor en ensayos de transfección transitoria, mostraron que en general la actividad transcripcional de la región B'B coincidía con la expresión del gen medida mediante RT-PCR (**fig. 28**). Estos resultados constataban la importancia de la región B'B no sólo en la línea MZ2-MEL (De Smet y col. 1995), sino en otras líneas de origen diferente.

Únicamente en el caso de las líneas LB23 y LB37 no hubo relación directa entre actividad transcripcional de la región B'B y la transcripción real de gen, sin embargo la proporcionalidad fue recuperada cuando ambas fueron sometidas a protocolo de desmetilación, lo cual indicaba que la región B'B se encontraba parcialmente metilada y que tras desmetilar quedaba totalmente abierta. En este sentido se sabe que mutaciones que afectan a uno de los dos puntos claves de la región B'B reducen la actividad transcripcional de ésta (De Smet y col. 1995). En este sentido se podía hacer un paralelismo funcional, entre lo que ocurre cuando una mutación afecta a un punto clave de interacción del factor nuclear Ets y el resultado de que el entorno de interacción de dicho factor esté metilado; el resultado podría

ser el mismo: la no unión del factor Ets a su secuencia diana.

Mediante estos ensayos se constató también que la desmetilación no afectaba la actividad transcripcional de la región B'B en la línea LB23, lo que indicaba que los factores transcripcionales estaban presentes y que lo que condicionaba la expresión real del gen era el estado metilado o no de esta región.

La línea HL60 no recuperó, sin embargo, la expresión de MAGE-1, lo cual podía explicarse por la actividad transcripcional tan baja de la región B'B. Como se ha dicho anteriormente la apertura del promotor constituye un primer paso, sin embargo la actividad transcripcional tan baja de la región B'B hace que la expresión sea mínima e indetectable mediante la técnica de PCR.

Otra posibilidad es que la línea HL60 responda de forma diferente al tratamiento con la droga DAC. Estudios realizados con diferentes líneas celulares tumorales, así como con cultivos celulares normales, han puesto de manifiesto que ciertos genes son más susceptibles de reexpresión en células transformadas que en células normales. Se argumentó que las células transformadas presentaban un estado general de metilación menor, y que ésto podría facilitar el que ciertas regiones del genoma, parcialmente desmetiladas, sufrieran una desmetilación total y rápida por parte de la droga DAC. Esto unido a diferencias en la capacidad de remetilación que puede ser más activa en células sanas que en células transformadas podía explicar la reexpresión diferencial de ciertos genes en células normales y transformadas (Gartle y Goldman 1994).

La línea HL60 podría ser un ejemplo de lo descrito anteriormente. Si bien no se trata de células normales, en este aspecto podrían ser similares; de hecho la línea HL60 mostró un perfil de metilación mayor en lo referente al promotor del gen Mage-1.

Quedaba, sin embargo, sin aclarar la no relación aparente existente entre la interacción de factores transcripcionales y la actividad transcripcional de la región B'B. Como ya se dijo anteriormente tanto las líneas negativas como las positivas en la expresión del gen Mage-1 retenían factores nucleares en los ensayos de movilidad, sin embargo la actividad transcripcional era diferente entre las líneas positivas y negativas. La respuesta puede estar en considerar la interacción factor nuclear/región B'B con un sentido diferente, es decir, nosotros únicamente detectamos interacción, pero no la efectividad de ésta. Podía ser un factor cuantitativo el implicado en la actividad transcripcional de la región B'B, lo cual no se pudo constatar.

Los resultados obtenidos con esperma merecen una especial atención. El análisis de metilación mostró que el promotor de Mage-1 presentaba un perfil similar al mostrado por aquellas líneas positivas en la expresión del gen. Exceptuando la heterogeneidad que las líneas presentaban en este sentido, el esperma mostró en los ensayos de Southern blot el mismo fragmento que identificaba a aquellas líneas positivas en la expresión de MAGE-1 (**fig. 23 y 24**). De igual forma los puntos denominados como claves en la regulación por metilación se encontraban parcial o

totalmente desmetilados (fig. 26).

Es sabido que los espermatozoides tienen una actividad sintética prácticamente nula, entonces ¿por qué el promotor de MAGE-1 se encontraba abierto?. Como se ha dicho anteriormente la proteína MAGE-1 podría expresarse en condiciones normales durante la embriogénesis temprana. En este caso puede que el gameto masculino aporte el promotor abierto de Mage-1, y que se mantenga de esta forma en el cigoto hasta que posteriormente es inactivado definitivamente mediante metilación en algún momento de la embriogénesis, antes de la maduración del sistema inmune. No sabemos que pasa en el caso del gameto femenino.

Podría pensarse también en sentido retrospectivo, es decir, la desmetilación del promotor MAGE-1 en espermatozoides, indicaría que el promotor ha sido activo en estadios precoces de la espermatogénesis. Una de las funciones atribuidas a la metilación es mantener inactivados los genes tejidos específicos en aquellos tejidos que no los expresan. La mayoría de estos genes carecen, al igual que Mage-1, de las "islas CpG" que son típicas de aquéllos que se expresan de forma constitutiva; además, por contra, las "islas CpG" se encuentran desmetiladas independientemente de la expresión del gen. Un aspecto interesante respecto a la metilación de genes tejidos específicos, es que no sólo se mantienen metilados en aquellos tejidos de expresión no programada, sino a que además también lo están en el esperma (Cedar y col. 1988). En el caso del gen Mage-1, la justificación de la desmetilación en esperma sería que las células germinales lo expresaría de forma específica.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por inmunohistoquímica, en los que el antisuero anti-MAGE-1 reconoció como positivo el epitelio germinal de los tubos seminíferos (**fig. 8a**).

Existen varias consideraciones que hay que tener en cuenta y que apoyarían la idea de que las células germinales, constituyendo el epitelio germinal, serían el tejido MAGE-1 positivo dentro del testículo. Por una parte, histológicamente, la existencia de la barrera hematotesticular, que impide el contacto de cualquier elemento del sistema inmune con el epitelio germinal. Esto explicaría por que las células germinales podrían expresar "sin problemas" la proteína MAGE-1. Por otra parte, las células germinales no expresan moléculas de histocompatibilidad() lo que impediría una presentación antigénica, por parte de estas células, al sistema inmune.

Todos estos resultados, convergen en que serían las células germinales las encargadas de expresar de forma fisiológica la proteína MAGE-1, y que posiblemente la desmetilación del promotor de Mage-1 en esperma lo mantenga abierto durante los primeros estadios de la embriogénesis, en los cuales podría también expresarse la proteína MAGE-1.

Hasta el momento se desconoce la función de la proteína MAGE-1, si bien su importancia actualmente radica en la capacidad de generar antígenos tumorales que pueden ser utilizados como diana de terapias antitumorales efectivas.



CONCLUSIONES

Una vez analizados y discutidos los resultados expuestos, concluimos que:

1. La proteína MAGE-1 interactúa con otras proteínas, con las que probablemente forme complejos, lo que hace su reconocimiento difícil cuando se utilizan antisueros generados frente a la proteína recombinante.
2. La expresión del antígeno MAGE-1, es compatible con el proceso de diferenciación celular.
3. El antígeno MAGE-1 constituye un epifenómeno dentro del proceso tumorigénico, siendo prescindible en el mantenimiento del estado transformado.
4. La región B'B del promotor del gen Mage-1, tiene la misma importancia transcripcional en líneas tumorales de diferente origen histológico.
5. El estudio de metilación del promotor del gen Mage-1, implica de forma indirecta al epitelio germinal como el tejido testicular que expresa la proteína MAGE-1 en condiciones fisiológicas.

BIBLIOGRAFIA

- Amar Costesec, A., Godelaine, D., Stockert, E., van der Bruggen, P., Beaufay, H., & Chen, Y.T. 1994.** The tumor protein MAGE-1 is located in the cytosol of human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 204: 710.
- Anichini, A., Fossati, G. and Parmiani, G. 1986.** Heterogeneity of clones from a human metastatic melanoma detected by autologous cytotoxic T lymphocyte clones. *J. Exp. Med.* 163: 215.
- Barber, L.D., & Parham, P. 1993.** Peptide binding to major histocompatibility complex. *Annu Rev Cell Biol*, 9: 163.
- Becker, J.C., Gillitzer, R., and Brocker, E.B. 1994.** A member of the melanoma antigen encoding gene (MAGE) family is expressed in human skin wound healing. *Int J Cancer*.
- Belldegrum, A., Muul, L.M. and Rosenberg, S.A. 1988.** Interleukin-2 expanded tumor infiltrating lymphocytes in human renal cell cancer: Isolation, characterisation, and antitumor activity. *Cancer Res.* 48: 206.
- Bird, A. 1992.** The essentials of DNA methylation. *Cell.* 70: 5.
- Brasseur, F., Marchand, M., Vanwijck, R., Herin, M., Lethe, B., Chomez, P., & Boon, T. 1992.** Human gene MAGE-1, which codes for a tumor-rejection antigen, is expressed by some breast tumors [letter]. *Int J Cancer*, 52: 839.
- Breathan, R. and Chambon, P. 1981.** Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 349.
- Brunner, K.T., McDonald, H.R., and Cerottini, J-C. 1980.** Antigenic specificity of the cytolytic T lymphocyte (CTL) response to murine sarcoma virus-induced tumors. II. Analysis of the clonal progeny of CTL precursor stimulated in vitro with syngeneic tumor cells. *J. Immunol.* 124:1627.
- Carey, M. Lin, Y-S., Green, M.R. and Ptashne, M. 1990.** A mechanism for synergistic activation of a mammalian gene by GAL4 derivatives. *Nature* 345:361.
- Cedar, H. 1995.** DNA methylation and gene activity. *Cell*, 53: 3.
- Cerottini, J.C., Nordin, A.A. and Brunner, K.T. 1970.** Specific in vitro cytotoxicity of thymus derived lymphocytes sensitized to alloantigens. *Nature* 228:1308.

- Colonna, M., Bresnahan, M., Bahram, S., Strominger, J.L., & Spies, T. 1992.** Allelic variants of the human putative peptide transporter involved in antigen processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 3932.
- Chen, Y.T., Stockert, E., Chen, Y., Garin Chesa, P., Rettig, W.J., van der Bruggen, P., Boon, T., & Old, L.J. 1994.** Identification of the MAGE-1 gene product by monoclonal and polyclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 1004.
- Dailey, L., Roberts, S.B. and Heintz, N. 1988.** Purification of the human histone H4 gene specific transcription factors H4TF-1 and H4TF-2. *Genes & Dev.* 2: 1700.
- Degiovanni, G., Lahay, T., Hérin, M., Hainaut, P. and Boon T. 1988.** Antigenic heterogeneity of a human melanoma tumor detected by autologous CTL clones. *Eur. J. Immunol.* 18:671.
- Degiovanni, G., Hainaut, P., Lahay, T., Weynants, P. and Boon, T. 1990.** Antigens recognized on a melanoma cell line by autologous cytolytic T lymphocytes are also expressed on freshly collected tumor cells. *Eur. J. Immunol.* 20: 1865.
- De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J.J., Szikora, J.P., De Smet, C., Brasseur, F., van der Bruggen, P., Lethe, B., Lurquin, C., & et al. 1994.** Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics*, 40: 360.
- De Plaen, E., Lurquin, C., Van Pel, A., Mariamé, B., Szikora, J-P, Wölfel, T., Sibille, C., Chomez, P., and Boon T. 1988.** Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: Cloning of the gene tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2274.
- De Smet, C., Courtois, S.J., Faraoni, I., Lurquin, C., Szikora, J.P., De Backer, O., & Boon, T. 1995.** Involvement of two Ets binding sites in the transcriptional activation of the Mage-1 gene. *Immunogenetics*, 42: 282.
- De Smet, C., Lurquin, C., van der Bruggen, P., De Plaen, E., Brasseur, F., & Boon, T. 1994.** Sequence and expression pattern of the human MAGE2 gene. *Immunogenetics*, 39: 121.
- De Vries, J., and Spits, H. 1984.** Cloned human cytotoxic T lymphocyte (CTL) lines reactive with autologous melanoma cells: I. In vitro generation, isolation, and analysis to phenotype an specificity. *J. Immunol.* 132: 510.

- Driscoll, J., Brown, M.G., Finley, D., & Monaco, J.J. 1993.** MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature*, 365: 262.
- Dyson, P.J., De Smet, C., Knight, A.M., Simon-Chazottes, D., Guénet, J.L., and Boon T. 1992.** Mapping of the genes encoding tum- transplantation antigens P91, P35B and P198. *Immunogenetics* 35: 316.
- Gartler, S.M., and Goldman, M.A. 1994.** Reactivation of inactive X-linked Genes. *Developmental Genetics*. 15: 504.
- Garrido, F., Cabrera, T., Concha, A., Glew, S., Ruiz Cabello, F., & Stern, P.L. 1993.** Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today*, 14: 491.
- Gaston, K., and Fried, M. 1995.** CpG methylation has differential effects on the binding of YY1 and ETS proteins to the bi directional promoter of the Surf-1 and Surf-2 genes. *Nucleic Acids Res* 23: 6.
- Gaugler, B., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., Romero, P., Gaforio, J.J., De Plaen, E., Lethe, B., Brasseur, F., & Boon, T. 1994.** Human gene *MAGE-3* codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med*, 179: 921.
- Germain, R.N., & Margulies, D.H. 1993.** The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol*, 11: 403.
- Golstein, P., Wigzel, H., Blomgren, H. and Svedmyr, E.A. 1972.** Cell mediating specific in vitro cytotoxicity: I. Probable autonomy of thymus-processed lymphocytes (T cells) for the killing of allogeneic target cells. *J. Esp. Med.* 135: 890.
- Green, M.R. 1986.** Pre-mRNA splicing. *Ann. Rev. Genet.* 20: 671.
- Harris, H.W., & Gill, T.J. 1986.** Expression of class I transplantation antigens. *Transplantation*, 42: 109.
- Heo, D.S., Whiteside, T.L., Johnson, J.T., Chen, K., Barnes, E.L. and Herbrman, R.B. 1987.** Long term interleukin 2-dependent growth and cytotoxic activity of tumor-infiltrating lymphocytes from human squamous cel carcinomas of head and neck. *Cancer Res.* 47: 6353.

Hérin, M., Lemoine, C., Weynants, P., Vessièrre, F., Van Pel, A., Knuth, A., Devos, R., and Boon, T. 1987. Production of stable cytolytic T-cell clones directed against autologous human melanoma. *Int J Cancer* 39: 390.

Hewitt, H., Blake, E. and Walder, A. 1976. A critique of evidence for active host defense based on personal studies of 27 murine tumors of spontaneous origin. *Brit. J. Cancer* 33: 241.

Hoon, D.S., Yuzuki, D., Hayashida, H., and Morton, D.L. 1995. Melanoma patients immunized with melanoma cell vaccine induce antibody responses to recombinant MAGE-1 antigen.

Iochim, H.L. 1979. The stroma reaction of tumors: an expression of immune surveillance. *J. Natl. Cancer Inst.* 57: 465.

Itoh, K., Tildenm A.B. and Balch, C.M. 1986. Interleukin 2 activation of cytotoxic T-lymphocytes infiltrating into human metastatic melanomas. *Cancer Res.* 46: 3011.

Jones, P.A., & Buckley, J.D. 1990. The role of DNA methylation in cancer. *Advances in Cancer Research*, 54: 1.

Kaszubowski, P.A., Husby, G., Tung, K.S.K. and Williams, R.C. 1980. T-lymphocyte subpopulation in peripheral blood and tissues of cancer patients. *Cancer Res.* 40: 4648.

Klein, E. and Klein, G. 1964. Antigenic properties of lymphomas induced by Moloney agent. *J. Natl. Cancer Inst.* 32:547.

Knuth, A., Danowski, B., Oettgen, H.F. and Old, L.J. 1984. T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell.

Kripke, M.I. 1974. Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light. *J. Natl. Cancer Inst.* 53: 1333.

Latcman, D.S. 1991. In: *Eukaryotic transcription factors*. Academic Press.

Lethé, B., Van den Eynde, B., Van Pel, A., Corradin, G. and Boon T. 1992. Mouse tumor rejection antigens P815A and P815B: two epitopes carried by a single peptide. *Eur. J. Immunol.* 22: 2283.

- Lewis, J.D., Meehan, R.R., Henzel, W.J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F. and Bird, A. 1992. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell*, 69: 905.
- Liao, S-M, Taylor, I.C.A., Kingston, R.E. and Young, R.A. 1991. RNA polymerase II carboxyterminal domain contributes to the response to multiple acidic activators in vitro. *Genes & Dev.* 5: 2431.
- Lurqin, C., Van Pel, A., Mariamé, B., De Plaen, E., Szikora, J-L., Janssens, C., Reddehase, M.T., Lejeune, J., and Boon T. 1989. Structure of tm-transplantation antigen P91A: The mutated exon encodes a peptide recognized with Ld by cytolytic T cells. *Cell* 58: 293.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning, A laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York).
- Maruyama, K., usami, M. Aizawa, T. and Yoshikawa, K. 1991. A novel brain-specific mRNA encoding nuclear protein (necdin) expressed in neurally differentiated embryonal carcinoma cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178:291.
- Maryanski, J.L. and Boon, T. 1982. Immunogenic variants obtained by mutagenesis of mouse mastocytoma P815: IV. Analysis of variant-specific antigens by selection of antigen-loss variants with cytolytic T cell clones. *Eur. J. Immunol.* 12: 406.
- Maryanski, J.L., Van Snick, J., Cerottini, J-C and Boon, T. 1982. Immunogenic variants obtained by mutagenesis of mouse matocytoma P815: III Clonal analysis of syngeneic cytolytic T lymphocyte response. *Eur. J. Immunol.* 12: 401.
- McMichel, A.J., Gotch, F.M. and Rothbard, J. 1986. HLA B37 determines an influenza A virus nucleoprotein epitope recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 164: 1397.
- Meehan, R.R., lewis, J.D., McKay, S., Kliner, E.L. and Bird, A.P. 1989. Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell.* 58: 499.
- Miescher, S., Whiteside, T.L., Moretta, L. and von Fliedner, V. 1987. Clonal and frequency analyses of tumor infiltrating T lymphocytes from human solid tumors. *J. Immunol* 138: 4004.

- Momburg, F., Neefjes, J.J., and Hammerling, G.J. 1994.** Peptide selection by MHC- encoded TAP transporters. *Curr. Opin. Immunol.* 6: 32.
- Mukherji, B. and McAlister, T.J. 1983.** Clonal analysis of cytotoxic T cell response against human melanoma. *J. Exp. Med.* 158: 240.
- Muller, H.P., Gerster, T. and Schaffner, W. 1988.** Enhancer sequences and the regulation of gene transcription. *Eur. J. Biochem.* 176: 485.
- Niwa, O., Yokota, Y., Ishida, H. and Sugahara, T. 1983.** Independent mechanisms involved in suppression of the Moloney leukemia virus genome during differentiation of murine teratocarcinoma cells. *Cell* 32: 1105.
- Nordeen, S.K. 1988.** Luciferase reporter gene vectors for analysis of promoters and enhancers. *BioTechniques* 6: 454.
- Oaks, M.K., Hanson, J.P., Jr., and O'Malley D.P. 1994.** Molecular cytogenetic mapping of the human melanoma antigen (MAGE) gene family to chromosome region Xq27-qter: Implications for MAGE immunotherapy. *Cancer Research* 54: 1627
- Parham, P., Benjamin, R.J., Chen, B.P., Clayberger, C., Ennis, P.D., Krensky, A.M., Lawlor, D.A., Littman, D.R., Norment, A.M., Orr, H.T., & et al. 1989.** Diversity of class I HLA molecules: functional and evolutionary interactions with T cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 54 Pt 1: 529.
- Poppema, S., Bröker, E., De Leij, L., Terbrack, D., Visscher, T., Ter Haar, A., Macher, E., Thé, T.H. and Sorg, C. 1983.** In situ analysis of the mononuclear cell infiltrate in primary malignant melanoma of the skin. *Clin. Exp. Immunol.* 51: 77.
- Prehn, R.T., and Main, J.M. 1957.** Immunity to methylcholantrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 18:769.
- Ptashne, M. and Gann, A. 1990.** Activators and targets. *Nature* 346: 329.
- Rabinowich, H., Cohen, R., Bruderman, I., Steiner, Z. and Klajman, A. 1987.** Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumor: lysis of autologous human tumor cells by cultured infiltrating lymphocytes. *Cancer Res.* 47: 173.
- Renkawitz, R. 1990.** Transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Genet.* 6: 192.

Rimoldi, D., Romero, P., & Carrel, S. 1993. The human melanoma antigen-encoding gene, MAGE-1, is expressed by other tumour cells of neuroectodermal origin such as glioblastomas and neuroblastomas [letter]. *Int J Cancer*, 54: 527.

Salgaller, M.L., Weber, J.S., Koenig, S., Yannelli, J.R., and Rosemberg, S.A. 1994. Generation of specific anti-melanoma reactivity by stimulation of human tumor-infiltrating lymphocytes with MAGE-1 synthetic peptide.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463.

Sanger, F. and Coulson, A.R. 1978. The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS lett.* 87: 107.

Sato, T., Sato, M., Takahashi, S., Koshiba, H. and Kikuchi, K. 1986. Specific cytotoxicity of long-term cultured T-cell clone on human autologous mammary cancer cells. *Cancer Res.* 46: 4384.

Schultz Thater, E., Juretic, A., Dellabona, P., Luscher, U., Siegrist, W., Harder, F., Heberer, M., Zuber, M., & Spagnoli, G.C. 1994. MAGE-1 gene product is a cytoplasmic protein. *Int J Cancer*, 59: 435.

Sharp, P.A. 1991. TFIIB or not TFIIB?. *Nature* 351: 16.

Slovin, S.F., Lackman, R.D., Ferrone, S., Kiely, P.E. and Mastrangelo, M.J. 1986. Cellular immune response to human sarcomas: cytotoxic T cell clones reactive with autologous sarcomas. *J. Immunol.* 137: 3042.

Smale, S.F. and Baltimore, D. 1989. The "initiator" as a transcription control element. *Cell* 57: 103.

Szeteras, L. and Daroczy, J. 1981. Electron microscopic investigation on the local cellular reaction to primary malignant melanoma. *Dermatologica* 163: 137.

Szikora, J-L., Van Pel, A., Brichard, V., André, M., Van Baren, N., Henry, P. and Boon, T. 1990. Structure of the gene of the tum- transplantation antigen P35B: presence of a point mutation in the antigenic allele. *EMBO J.* 9: 1041.

Taylor, P.M., Davey, J., Howland, K., Rothbard, J.B. and Askonas, B.A. 1987.

Class I MHC molecules rather than other mouse genes dictate influenza epitope recognition by cytotoxic T cells. *Immunogenetics* 26: 267.

Topolian, S.L., Solomon, D. and Rosenberg, S.A. 1989. Tumor-specific cytotoxicity by lymphocytes infiltrating human melanomas. *J. Immunol.* 142: 3714.

Traversari, C., van der Bruggen, P., Van den Eynde, B., Hainaut, P., Lemoine, C., Ohta, N., Old, L. and Boon, T. 1992a. Transfection and expression of a gene coding for a human melanoma antigen recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes. *Immunogenetics* 35: 145.

Traversari, C., Van der Bruggen, P., Luescher, I.F., Lurquin, C., Chomez, P., Van Pel, A., De Plaen, E., Amar-Costesec, A. and Boon, T. 1992b. A nonpeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytotoxic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J. Exp. Med.* 176:1453.

Uyttenhove, C., Maryanski, J., and Boon, T. 1983. Escape of mouse mastocytoma P815 after nearly complete rejection is due to antigen-loss variants rather than immunosuppression. *J Exp Med* 157: 1040.

Van der Bruggen, P., Bastin, J., Gajewski, T., Coulie, P.G., Boël, P., De Smet, C., Traversari, C., Townsend, A., and Boon T. 1994. A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytotoxic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3. *Eur. J. Immunol.* 24: 3038.

Van der Bruggen, P., Szikora, J.P., Boël, P., Wildman, C., Somville M., Sensi, M., and Boon, T. 1994. Autologous cytotoxic T lymphocytes recognize a MAGE-1 nonpeptide on melanomas expressing HLA-Cw 1601. *Eur. J. Immunol.* 24: 2134.

Van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254: 1643.

Van Pel, A. and Boon, T. 1992. Protection against a nonimmunogenic mouse leukemia by an immunogenic variant obtained by mutagenesis. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4718.

- Van Pel, A., Vessièrè, F. and Boon, T. 1983.** Protection against two spontaneous mouse leukemias conferred by immunogenic variant obtained by mutagenesis. *J. Exp. Med.* 157: 1992.
- Von Heijne, G. 1982.** Signal sequences are not uniformly hydrophobic. *J. Mol. Biol.* 159: 537.
- Vose, B.M. and Bonnard, G.D. 1982.** Human tumor antigens defined by cytotoxicity and proliferative responses of cultured lymphoid cells. *Nature* 296: 359
- Wagner, H. and Röllingen, M. 1973.** In vitro induction of tumor-specific immunity: I. Parameters of activation and cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells immunized in vitro against syngeneic and allogeneic plasmacytoma cell tumor. *J. Exp. Med.* 138: 1.
- Wasylyk, B., Hahn, S.L., and Giovane, A. 1993.** The Ets family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 211: 7.
- Weber, J., Salgaller, M., Samid, D., Johnson, B., Herlyn, M., Lassam, N., Treisman, J., & Rosenberg, S.A. 1994.** Expression of the MAGE-1 tumor antigen is up-regulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* 54: 1766.
- Weiss, L. and Reinberg, D. 1992.** Transcription by RNA polymerase II: initiator-directed formation of transcription-competent complexes. *FASEB J.* 6: 3300.
- Wilks, A., Seldran, M. and Jost, J-P. 1985.** An estrogen-dependent demethylation at the 5' end of the chicken vitellogenin gene is independent of DNA synthesis. *Nucl. Acids. Res.* 12: 1163.
- Yssel, H., Spits, H. and De Vries, J. 1984.** A cloned human T cell line cytotoxic for autologous and allogeneic B lymphoma cells. *J. Exp. Med.* 160:239.
- Zagury, D., Morgan, D., Lenoir, G., Fouchard, M. and Feldman, M. 1983.** Human normal CTL clones: Generation and properties. *Int. J. Cancer.* 31: 427.
- Zinkernagel, R.M. and Doherty, P.C. 1974.** Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248: 701.

Zinkernagel, R.M. and Doherty. P.C. 1979. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv. Immunol.* 27:51.