

Tesis Doctoral

# Estudio sobre funciones específicas de proteínas MAGE-I y su relevancia en oncología

Toledo, María Fernanda

2015-06-11

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Toledo, María Fernanda. (2015-06-11). Estudio sobre funciones específicas de proteínas MAGE-I y su relevancia en oncología. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Toledo, María Fernanda. "Estudio sobre funciones específicas de proteínas MAGE-I y su relevancia en oncología". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-06-11.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**Universidad de Buenos Aires**

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**Departamento de Química Biológica**

**Estudio sobre funciones específicas de proteínas  
MAGE-I y su relevancia en oncología.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos  
Aires en el área de Química Biológica

**Licenciada María Fernanda Toledo**

**Director de tesis:** Dr. Martín Monte

**Consejero de Estudios:** Dr. Mario Galigniana

**Lugar de trabajo:** Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Departamento de Química Biológica, IQUIBICEN UBA-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2015

Fecha de defensa: 11 de junio 2015

# Estudio sobre funciones específicas de las proteínas MAGE-I y su relevancia en oncología.

## Resumen

Las proteínas MAGE-I (Melanoma Antigen Gene) constituyen una de las familias multigénicas más grandes con expresión tumoral, la cual agrupa a los Mage-A, Mage-B, Mage-C. Estos genes se caracterizan por su expresión específica en tumores, por su alta conservación de secuencia (todos contienen un dominio común llamado MHD, Mage Homology Domain) y por su localización en el cromosoma X. Las primeras observaciones funcionales mostraron una correlación entre los altos niveles de expresión algunos Mage-A y la resistencia a drogas antitumorales. Así es que en los últimos años se ha investigado la potencial función de estos genes en distintos modelos. Nuestro grupo de trabajo ha aportado al estudio de los genes *mage-1* el mecanismo por el cual MageA2 causa la resistencia a ciertos agentes quimioterapéuticos e impide el gatillado de la senescencia inducida por PML mediante la activación de oncogenes como Ha-Ras. Estos mecanismos involucran, por un lado, la interacción de MageA2 con el oncosupresor p53 y la inhibición de su actividad transcripcional por la unión MageA2/HDAC3 (deacetilasa de histonas 3) formando el complejo inhibitorio p53/MageA2/HDAC3; y, por otro lado, une en forma directa a PML-IV (proteína de la leucemia promielocítica-3) interfiriendo en el eje PML-IV/p53.

Las observaciones sobre la función y/o localización de otros MAGE-I nos llevaron a elaborar nuestra primera hipótesis: la conservación de secuencia dentro de esta familia de proteínas no implicaría necesariamente una redundancia funcional. Por otro lado, dada la relevancia de la función de p53, nos llevó a formular nuestra segunda hipótesis de trabajo: podrían existir vías intracelulares capaces de proteger a p53 de la actividad de MageA2.

En la primera parte de este trabajo de Tesis caracterizamos otro miembro de la familia MAGE-I, del subgrupo B: la proteína MageB2 logrando evidenciar que la expresión de MageB2 induce proliferación en distintas líneas celulares en forma independiente de la inhibición de p53. Vinculamos la actividad de MageB2 a la regulación de factores de transcripción pro-oncogénicos como de la familia E2Fs y c-Myc. Además MageB2 se acumula en el nucléolo, aunque su distribución comprende tanto en citoplasma como en el núcleo también, dato que nos llevó a evaluar y evidenciar su asociación a los ribosomas.

En la segunda parte de este trabajo de Tesis determinamos que la expresión de p14ARF (p14, Alternative Reading Frame) revierte la inhibición que MageA2 ejerce sobre p53 causando la relocalización de MageA2 del núcleo a los nucléolos en forma similar a lo que hace con Mdm2, un inhibidor de la función de p53.

En conjunto, estos resultados demuestran que las proteínas MAGE-I podrían participar en el balance que existe en las células tumorales entre factores pro-oncogénicos y proteínas supresoras de tumor. Ciertas proteínas MAGE-I como MageA2 puede bloquear la actividad de p53, pero a su vez ser regulada por p14-ARF (en el caso que la célula tumoral la expresara). Por otro lado MageB2 colabora con el fenotipo proliferativo mediante la regulación de factores de transcripción oncogénicos como E2Fs y c-Myc.

### **Palabras Clave:**

Células tumorales; proteínas MAGE; dominios MHD; proliferación celular; factores transcripcionales p53, E2F and c-Myc; supresor tumoral p14ARF; proteínas ribosomales; actividad transcripcional; traducción celular; biogénesis ribosomal.

# Study on specific functions of MAGE-I proteins and its relevance in Oncology.

## Abstract

MAGE-I (Melanoma Antigen Gene) proteins are one of the larger tumor expression multigenic families, which bring together the Mage-A, Mage-B, Mage-C. These genes are characterized by its specific expression in tumors, by its high sequence conservation (all contain a common domain called MHD, Mage Homology Domain) and because of its location on the X chromosome. The first functional observations showed a correlation between the Mage-A high expression levels and its resistance to antitumor doxorubicin and paclitaxel drug. So, among this past few years it have been published works about the potential function of these genes. Our working group had contributed to the *mage-1* genes study describing the mechanism by which MageA2 causes the resistance to certain chemotherapeutic agents in human melanoma cells and reduces the senescence induced by oncogenes such as ha-Ras in normal cells. This mechanism involves inhibition of the transcriptional activity of the p53 oncosupresor by the action of histone deacetylases, HDACs. More recently, we have shown that MageA2 is capable to bound directly to PML-IV (promyelocytic leukemia protein-IV) interfering with the senescence induced by the PML-IV/p53 axis.

Our observations on the function and/or localization of others MAGE-I proteins led us to develop our a first hypothesis: the conservation of sequence within the MAGE-I family not necessarily implies functional redundancy. On the other hand, given the importance of p53 function, our second hypothesis is that: there might be some intracellular pathway able to protect p53 activity from MageA2.

In the first part of this Thesis work we have characterized another MAGE-I family member from B group: the MageB2 protein, showing that its expression induces proliferation in different cell lines independently of p53. MageB2 links this activity to the regulation of pro-oncogenic transcription factors, as c-Myc and E2Fs family. Also, MageB2 accumulates in the nucleolus, although distribution comprises both in cytoplasm and nucleus too. These data prompted us to verify and evidence that MageB2 could be linked to ribosome function.

In the second part of this thesis we determined that p14ARF (p14, Alternative Reading Frame) expression reverses the MageA2 inhibition exerted on p53. We observed that p14ARF expression causes MageA2 relocalization from the nucleoplasm to the nucleoli in a similarly way that relocates Mdm2, an inhibitor of p53 function.

Taken together, these results demonstrate that MAGE-I proteins may participate in the balance that exists in tumor cells between pro-oncogenic factors and tumor suppressor proteins. Certain MAGE-I proteins such as MageA2 can block the p53 activity, but in turn can be regulated by p14ARF (in the case that the tumor cell express it). On the other hand, MageB2 collaborates with the proliferative phenotype through regulation of oncogenic transcription factors such as E2Fs and c-Myc.

### **Keywords:**

Tumor cells; MAGE proteins; MHD domains; cellular proliferation; p53, E2F and c-Myc transcriptional factors; tumor suppressor protein p14-ARF; transcriptional activity; cellular translation; ribosome biogenesis.

Parte de los resultados presentados en este trabajo formaron parte de trabajos presentados en el Congreso de Sociedad Argentina de Investigación Clínica:

- **Regulación de la proteína tumoral MageA2: nuevas funciones de p14ARF y RPL11 en la activación de p53.** MF Toledo, M Monte. Noviembre, 2014
- **MageB2 es una proteína tumoral asociada a los ribosomas que estimula la proliferación celular.** M.F.Toledo, M.F.Ladelfa, L.Y.Peche, J.E.Laiseca, C.Schneider, M.Monte. Noviembre, 2013
- **MageB2 colabora en la regulación de la proliferación celular inducida por c-myc y E2F.** M.F.Toledo, M.F.Ladelfa, L.Y.Peche, J.E.Laiseca, C.Schneider, M.Monte. Noviembre, 2012
- **La expresión de la proteína tumoral MAGE-B2 confiere a las células ventajas proliferativas.** Ladelfa, M .F.; Laiseca, J. E.; Toledo, M.F.; Dusetti, N.; Monte M. Noviembre, 2012
- **Regulación transcripcional de la expresión de los genes Mage-A.** M.F. Toledo, L.Y. Peche, M. Monte. Noviembre, 2011
- **Mecanismos de resistencia a la apoptosis por expresión de proteínas de la familia MAGE-I.** Ladelfa F., Peche L., Cangelosi R., Toledo M., Dusetti N., Scheneider C., Monte M. Noviembre, 2010

- **Relocalización de proteínas MAGE-A en respuesta a la activación de la vía de p53.** MF Toledo, LY Peche, JE Laiseca, MD Galigniana, C Schneider, M Monte. Noviembre, 2009

Además, algunos de los resultados aquí presentados, fueron partícipes en los trabajos:

- **Human MageB2 Expression Enhances E2F Activity, Cell Proliferation And Resistance To Ribotoxic Stress."** Peche LY, Ladelfa MF, Toledo MF, Nano M, Laiseca JE, Schneider C, Monte M. Enviado a **JBC** en Octubre 2014, actualmente se están haciendo las correcciones propuestas por los revisores.
- **Tumor-specific MAGE proteins as regulators of p53 function.** MF Ladelfa, LY Peche, MF Toledo, JE Laiseca, M Monte, C Schneider, M Monte. *Cancer Letters*. 2012 Jun 01; 325 (1) 11–17.
- **ROS in tumor suppressive and oncogenic signaling pathways and their connection with p53.** MF Ladelfa, MF Toledo, J Laiseca, M. Monte. *Antioxidants & redox signaling*. 2011 Sep 15; 15(6):1749-61. Epub 2011 Apr 14.



# Agradecimientos

---

Mi más sincero agradecimiento a quienes han formado parte de este proyecto personal:

A mi familia, especialmente a mi mamá Ana María por ser un pilar anímico fundamental, por su cariño, por su fuerza, por insistirme para que siga estudiando siempre....

Gracias por enseñarme eso, gracias por TODA mi educación y por tanto AMOR.... A mi hermano, por ser mi compañero en las peores y en las mejores y siempre confiar en mí..... A Gra, por estar, por ser parte, por quererme y cuidarme siempre..... A mi tía Betty y a Cori, por sus consejos de vida..... y a los que se fueron yendo, porque me hicieron quien soy y porque me siguen enseñando.

Al Dr. Martín Monte, mi director, quien generosamente me dio la oportunidad de integrar su grupo de investigación como estudiante de doctorado, permitiéndome llevar a cabo el presente trabajo de Tesis Doctoral bajo su dirección, transmitiéndome sus conocimientos, experiencia y su interés por la investigación experimental.

A mis compañeras del laboratorio con quienes compartí el esfuerzo diario, recibiendo siempre su desinteresada colaboración y buena predisposición. A La Lic. Juli Laiseca porque desde el inicio me brindó su tiempo, sus conocimientos y su ayuda.... a la Dra. Fa Ladelfa quien desde que comenzó en el laboratorio siempre me enseñó no sólo el trabajo de mesada, sino su apoyo incondicional, también le quiero agradecer a Seba por ser el veterinario de este grupo y porque junto a Fa, trajeron a Felipin a este mundo..... Y a la Lic. Carito Bret, la chiquita, que entró no hace mucho, pero que su presencia hizo que creyera en una amiga y una hermana menor sin dudarle. Porque me bancaron todos los días, por las charlas y más charlas entre mates, por los viajes, por ser mis compañeras, psicólogas y amigas.

A los grupos de investigación cercanos que siempre estuvieron dispuestos a darme una mano. Al grupo de: Ale Guberman, Diego Laderach y Dani Compagno, Edu Cánepa, Federico Coluccio, Adalí Pecci, Elba Vázquez, Mario Galigniana muchas gracias por la

buena onda.... Pero más agradezco por los amigos que allí encontré: Clau, Sole, Dani, Feli, Luqui, Ari, Guille, Papa, Ani, Delfi, Esteban, Marto, Charly, y demases..... sepan que sin uds. no hubiera sido lo mismo transitar este largo proceso, eternas gracias por la ayuda brindada siempre que pudieron, y más gracias por los mates y las tortas, por los afters, por las frescas en deportes, por los fernets al costado, por las cenas y por las charlas.... y prométanme que no van a dejar de hacerlo, porque yo ya no voy a estar para arengarlos!!!

A mis amigos del alma y de la vida.... a L@s del CLUB , a Loquita Shimmy, a Carli, a Marian, a Dani y a Pato, está claro que sin ustedes no sería quien soy hoy.... Son mi familia elegida y no verlos es extrañarlos infinitamente..... Gracias por bancarme hasta el último segundo y por estar SIEMPRE!!!

Y, por último, pero no menos importantes a la compañía y a tod@s aquell@s que en este último tiempo pasaron a ser muy importantes en mi vida por brindarme su apoyo y comprensión a lo largo del camino.....

También agradezco a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por otorgarme la beca de Iniciación de Doctorado; al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, por la Beca de Postgrado Tipo II; y al Instituto Nacional del Cáncer por la beca de finalización de doctorado.

Y sobretodo a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, por ser casi como mi segundo hogar, el lugar donde me formé, y donde se me dio un espacio para realizar esta tesis. Por ser una de las mejores universidades que hay. Por ser pública, laica, de alta calidad y gratuita, que es un derecho que todos tenemos que defender para que cada vez pueda llegar a más gente.

**GRACIAS TOTALES!!!!!!**

*A Fernando,  
mi papá,  
mi ángel guardián,  
por ayudarme a triunfar.*

*“El éxito es aprender a ir de  
fracaso en fracaso sin desesperarse”*

**Winston Churchill**

---

<b>Índice</b> .....	a
<b>Abreviaturas</b> .....	i
<b>Introducción</b> .....	1
Oncogénesis .....	2
1. Proliferación celular .....	2
2. Supresores Tumorales y Oncogenes.....	12
El "guardián del genoma", el supresor tumoral p53.....	17
El oncogen Mdm2 y su antagonista el supresor tumoral p14ARF .....	21
PML-IV como supresor tumoral.....	28
La vía de pRb y el factor de transcripción E2F .....	30
El oncogen c-Myc .....	34
Familia de proteínas MAGE .....	37
1. Generalidades.....	37
2. Estructura proteica de la familia multigénica MAGE.....	40
2.1. Subfamilia MAGE-I .....	42
2.1.1. Función de proteínas del Grupo Mage-A .....	42
2.1.2. Función de proteínas del Grupo Mage-B .....	49
2.1.3. Función de proteínas del Grupo Mage-C .....	53
2.2. Subfamilia MAGE-II.....	54
2.2.1. Necdina.....	54

2.2.2. Grupo Mage-D .....	54
3. Regulación transcripcional de los genes mage .....	55
4. Estructura génica.....	57
Aplicaciones de la Biología Molecular al diagnóstico, pronóstico	
y tratamiento del cáncer .....	59
<b>Hipótesis y Objetivos.....</b>	<b>62</b>
Hipótesis .....	63
Objetivos .....	64
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>65</b>
I. Criopreservación .....	66
I.a. Congelamiento .....	66
I.b. Descongelamiento.....	66
II. Esterilización de materiales y soluciones.....	66
III. Calidad del agua y reactivos .....	67
IV. Cultivo celular .....	67
IV.a. Propagación y mantenimiento de las líneas celulares .....	67
IV.b. Viabilidad y recuento celular.....	68
V. Transfección .....	68
V.a. Polietilimina (PEI) .....	68
V.b. Lipofectamina.....	69

VI. Transducciones virales.....	70
VII. Evaluación de proliferación .....	71
VII.a. Curvas de crecimiento.....	71
VII.b. Crecimiento independiente de anclaje .....	71
VII.c. Migración celular .....	72
VII.d. Formación de colonias .....	72
VIII. Análisis de proteínas .....	73
VIII.a. Western Blot .....	73
- SDS-PAGE.....	73
- Electrotrotransferencia e inmunoblotting .....	73
- Anticuerpos utilizados.....	74
VIII.b. Análisis de interacciones proteicas por Inmunoprecipitación .....	75
VIII.c. Análisis de localización celular por fraccionamiento subcelular .....	76
VIII.d. Purificación de Ribosomas .....	77
- Perfil de Polisomas en gradientes continuos .....	77
VIII.e. Precipitación proteica con ácido tricloroacético (TCA) .....	78
VIII.f. Ensayo de estabilidad de proteica de MageA2 .....	78
- Tratamiento con cicloheximida (CHX) .....	78
- Co-transfecciones.....	78
- Tratamiento con tricostatina A (TSA) .....	79
VIII.g. Inmunofluorescencia.....	80
- Acticuerpos secundarios utilizados .....	81
IX. Evaluación de la expresión génica.....	82
IX.a. Ensayos de genes reporteros.....	82
- Medición de la actividad Luciferasa Firefly .....	82
- Medición de la actividad Luciferasa Renilla.....	82

IX.b. Evaluación de los niveles de ARN mensajero .....	83
- Extracción y cuantificación de ARN.....	83
- Retrotranscripción .....	84
- PCR cuantitativa en tiempo real.....	85
- <i>Primers</i> utilizados .....	85
- Precauciones para mantener la calidad de los procedimientos .....	85
- Análisis de los datos.....	86
X. Tratamiento estadístico .....	86
XI. Clonados.....	86
- Extracción de ADN genómico a partir de células.....	86
- PCR a punto final .....	87
- Análisis de los productos de amplificación .....	88
- Reacción de digestión .....	88
- Purificación de los productos de PCR y vectores digeridos.....	89
- Hibridización de los oligonucleótidos NLS.....	90
- Reacción de Ligación .....	90
XII. Descripción de los vectores.....	91
XII.a. Vector pEGF-C1 .....	91
XII.b. Vector pGL3(Basic)-Luc .....	92
XII.c. Vector pGEX-4T-3 .....	93
XII.d. Vector pcDNA <sub>3</sub> -HA-MageA4 .....	94
XIII. Transformación celular bacteriana.....	95
XIII.a. Preparación de bacterias ultracompetentes .....	95
XIII.b. Transformación Química de bacterias ultracompetentes .....	95
XIII.c. Selección de los clones positivos.....	96
XIII.d. Stock de Glicerol .....	96

XIV. Preparación de ADN plasmídico a mediana escala (Midiprep) .....	96
XV. Generación de anticuerpos .....	97
- Producción de la proteína recombinante GST-MageB2 (30-116) .....	97
- Detección de la proteína GST-MageB2 (30-116) .....	98
- Cuantificación de la proteína GST-MageB2 (30-116) .....	98
- Producción de suero de conejo contra GST-MageB2 (30-116) .....	99
- Purificación anticuerpos contra el suero de conejo .....	99
- Análisis del suero de conejo contra GST-MAGEB2 (30-116) .....	100
XVI. Descarte del material biológico y residuos peligroso.....	100
<b>Resultados .....</b>	<b>101</b>
<u>Parte 1:</u> Caracterización de MageB2 humano.....	102
1. MageB2 induce la Proliferación celular de manera independiente del estado de p53 .....	102
2. La expresión de MageB2 estimula la actividad transcripcional del factor E2F.....	112
3. Localización celular de MageB2 .....	122
4. Relación entre MageB2 y los ribosomas.....	127
4.1. MageB2 y los ribosomas nucleares .....	128
4.2. MageB2 y los ribosomas citoplasmáticos .....	129
5. Regulación del promotor de MageB2 .....	132
<u>Parte 2:</u> Caracterización de inhibidores de MageA2 humano.....	136



6. Especificidad de diferentes Mage-A en la capacidad inhibitoria sobre p53 .....	136
7. Regulación de la actividad de MageA2 sobre p53 .....	140
7.1. Proteína Ribosomal L11 como regulador de MageA2.....	140
7.2. El oncosupresor p14ARF como regulador MageA2 .....	146
<b>Discusión</b> .....	154
Conclusiones .....	160
<b>Bibliografía</b> .....	161

# Abreviaturas

---

3' UTR	<i>3' untranslated region</i> (Región 3' No Traducible)
5' UTR	<i>5' untranslated region</i> (Región 5' No Traducible)
ActD	Actinomicina D
ADN	Ácido Desoxiribonucleico.
ADNc	ADN Complementario
AR	<i>Androgen Receptor</i> (Receptor de Andrógenos)
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNi	ARN de interferencia
ARNm	ARN mensajero
ARNsa	Ribonucleasa
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i> (gen mutado en la ataxia-telangiectasia)
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i> (proteína ataxia-telangiectasia relacionada con Rad 3)
Bax	<i>Bcl-2 Associated X Protein</i> (Proteína X Asociada a Bcl-2)
Bcl-2	<i>B-Cell Lymphoma 2</i> (Linfoma de Células B 2)
BRCA	<i>Breast Cancer</i> (Proteínas Involucradas en Cáncer de Mama).
BRCA-1, -2	<i>Breast cancer type 1 or 2 susceptibility protein</i>
BrdU	<i>5-bromo-2'-deoxyuridine</i> (Bromodesoxiuridina)
BSA	Seroalbúmina Bovina
CBP	<i>CREB-binding Protein</i> (Proteína de Unión a CREB)
CDK	<i>Cyclin-dependent kinases</i> (quinasas dependientes de ciclinas)
CDS	Secuencia Codificante
ChIP	Inmunoprecipitación de la Cromatina
ChK-1, -2	<i>Checkpoint Kinase 1 or 2</i> (Quinasa de punto de control 1 o 2)
CTAs	<i>Cancer testis antigens</i>

CTCF	<i>CCCTC-binding factor</i>
CTL	<i>Cytotoxic T Lymphocyte</i> (Linfocitos T Citolítico)
CXH	Cicloheximida
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DKO	Línea Celular de fibroblastos embrionarios doble <i>Knock Out</i> para mdm2 y p53
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetil Sulfóxido
ADNasa	Desoxiribonucleasa
DNMT1/3b	<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1/3 beta</i>
DNMTs	Metiltransferasa de ADN
dNTP	Nucleótido de ADN
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (Factor de Crecimiento Epidérmico)
ER	Enzimas de Restricción
FD	Factor de Dilución
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i> (Receptor del Factor de Crecimiento de Fibroblastos)
FN	Fibronectina
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gliceraldehído 3-fosfato Deshidrogenasa)
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (Proteína Fluorescente Verde)
Glp	G9a-like protein
GR	<i>Glucocorticoid Receptor</i> (receptor de glucocorticoides)
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	Agua destilada
H <sub>2</sub> O <sub>mq</sub>	Agua Milli Q
HCT116	Línea Celular de Colón Humano
HCT116 p53 <sup>-/-</sup>	Línea Celular de Colón Humano <i>knock out</i> para p53

HDACs	<i>Histone Deacetylases</i> (Histona Deacetilasas)
HEK293T	Línea Celular de Riñón Embrionario Humano
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (Antígenos Leucocitarios Humanos)
IP	Inmunoprecipitación
KAP1	<i>KRAB-ZFP-associated protein 1</i>
MAGE	<i>Melanoma Antigen Genes</i> (Genes Antígenos de Melanoma)
Mdm2	<i>Murine Doble Minute 2</i> (Doble Minuto Murino 2)
MEF	Fibroblastos Embrionarios Murinos
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complejo Mayor de Histocompatibilidad)
MHD	<i>MAGE Homolgy Domain</i> (Dominio de Homología MAGE)
Miz	<i>Myc-Interacting Zinc Finger PROTEIN</i> (Myc-Interacción de Proteína de dedos de Zinc)
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> (Factor Nuclear kappa-cadenas ligeras potenciador de las células B activadas)
NLS	<i>Nuclear localization signal</i> (Señal de Localización Nuclear)
NoLS	<i>Nucleolar localization signal</i> (Señal de Localización Nucleolar)
NRAGE	<i>Neurotrophin receptor-interacting MAGE homolog</i> (Homólogo receptor-interactor de Neurotrofina)
MAGE	
p14ARF	<i>p14 Alternative reading frame protein</i> (Proteína p14 de marco de lectura abierto)
p75NTR	<i>p75 Neurotrophin Receptor</i> (Receptor Neurotrofina p75)
PBS	<i>Buffer</i> Fosfato Salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PML	<i>Promyelocytic Leukemia Protein</i> (Proteína de la Leucemia Promielocítica)
PML-NBs	<i>Promyelocytic leukemia-nuclear bodies</i> (cuerpos nucleares de

	PML)
pRb	<i>Retinoblastoma Protein</i> (Proteína del Retinoblastoma)
Prmt	Proteína Metiltransferasa de Argininas
PUMA	<i>p53 Upregulated Modulator of Apoptosis</i> (Modulador de la Apoptosis p53 Regulado Positivamente)
qPCR	Reacción en Cadena de la polimerasa Cuantitativa
RING	<i>Really interesting new gene</i>
RISC	Complejo de Silenciamiento Inducido por ARN
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Especies Reactivas de Oxígeno).
RT-MMLV	Transcriptasa Reversa del Virus de Leucemia Murina Maloney
RT-qPCR	<i>Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción cuantitativa en Cadena de la Polimerasa a partir de una Transcripción Reversa)
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SFB	Suero Fetal Bovino
siRNA	<i>small interference RNA</i> (ARN pequeños interferentes)
SKIP	<i>Ski interacting protein</i> (Proteína Interactora Ski)
T4 lig	ADN Ligasa T4
Taq-Pol	ADN Polimerasa Taq
TRIM28	<i>Tripartite motif-containing 28</i>
TSA	Trichostatin A
U2OS	Línea Celular de osteosarcoma humano

# Introducción

# Oncogénesis

---

## 1. Proliferación celular

El cáncer es un término que describe más de cien enfermedades diferentes que tienen una propiedad en común: una proliferación celular anormal. A pesar de los enormes esfuerzos que se están realizando para poder entender y revertir esta enfermedad, la mayor parte de las investigaciones siguen siendo clínicamente insatisfactorias.

Para poder diseñar nuevas terapias que sean efectivas contra esta enfermedad, es esencial descifrar los detalles moleculares, abarcando tanto las vías claves que controlan la progresión del ciclo celular como los defectos moleculares que ocurren en las células tumorales (Parmigiani, Boca et al. 2009, Stratton 2011).

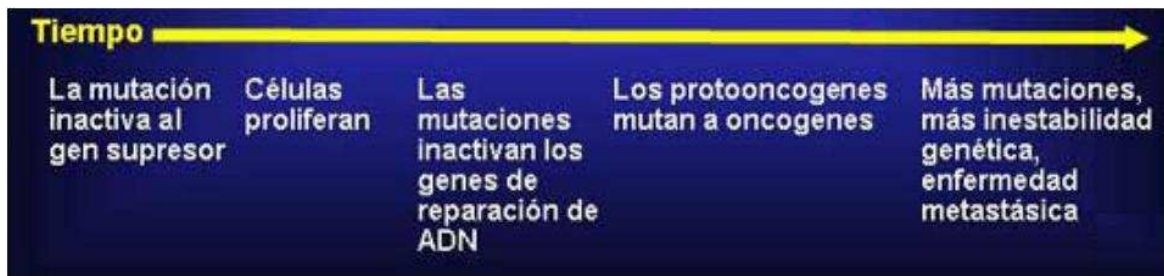
El cáncer es generalmente clasificado según el tejido a partir del cual las células tumorales se originan. Un diagnóstico definitivo de la enfermedad requiere un examen histológico. Muchos cánceres pueden ser tratados y algunos curados, dependiendo del tipo, la localización y la etapa o estado en el que se encuentre. Una vez detectado, se trata con la combinación apropiada de cirugía, quimioterapia y/o radioterapia. Los tratamientos se especifican según el tipo de cáncer y también del propio paciente. Esta enfermedad es causada por diferentes anormalidades en el funcionamiento de las células (Albertson, Collins et al. 2003, Hoglund, Gisselsson et al. 2005). Estas anormalidades pueden ser heredadas o provocadas principalmente por agentes carcinógenos. Entre los principales agentes carcinógenos están las radiaciones de origen ionizante y ultravioleta, ciertos productos químicos y algunos tipos de virus (Haverkos 2004). Otras anormalidades genéticas cancerígenas pueden ser adquiridas durante la replicación normal del ADN al no corregirse los errores que se podrían producir durante la misma (Varmus 1993). Por ello, una significativa contribución al tratamiento del cáncer se ha logrado a través de estudios en los que se logra identificar el/las principales causas o mecanismos desregulados en ciertos tumores, identificando potenciales supresores tumorales y oncogenes. Estas investigaciones han proporcionado datos importantes para comprender los mecanismos moleculares involucrados y cómo controlarlos (Futreal, Coin et al. 2004, Bonetta 2005,

International Cancer Genome, Hudson et al. 2010). Así es como en los últimos años, se han conseguido diseñar nuevas moléculas (como ARN pequeños de interferencia o anticuerpos monoclonales) o utilizar otras ya pre-existentes para combinar con tratamientos que actúen específicamente en anomalías moleculares de ciertos tumores y minimizar el daño colateral a las células normales (Breitbach, Burke et al. 2011, Scott, Wolchok et al. 2012, Basu, Bodycombe et al. 2013, Deng, Wang et al. 2014).

Las últimas dos décadas han aportado un enorme esfuerzo y avance en la caracterización de los cambios genómicos asociados a cada tipo de cáncer y de las vías de señales que resultan alteradas por dichos cambios dando lugar a las alteraciones celulares presentes en las distintas neoplasias (Kan, Jaiswal et al. 2010, Watson, Takahashi et al. 2013). El crecimiento celular autónomo es una de las características comunes a todas ellas, tanto benignas como malignas. La desregulación del ciclo celular ocurre como resultado de alteraciones en la transducción de señales aunque no necesariamente supone un aumento en la proliferación celular; sino que como se explica con más detalle adelante, lo que resulta importante es el balance crítico entre, por un lado el crecimiento celular y la progresión del ciclo (división celular) y, por el otro, la apoptosis. Tanto durante el desarrollo embrionario normal como durante la vida de adulto, la señalización celular requiere estar meticulosamente coordinada e integrada en todo momento. A su vez, es fundamental que las señales de diferenciación estén adecuadamente reguladas para prevenir la oncogénesis. El dogma que establece una relación inversa entre el grado de diferenciación y proliferación celular (un tumor maligno tiende a estar más dediferenciado que su tipo celular progenitor) confirma claramente este principio (Reya, Morrison et al. 2001).

La observación clínica indica que el desarrollo de los tumores es ordinariamente un proceso lento. Esto implica que la progresión tumoral requiera frecuentemente el paso de muchos años, por lo que el cáncer es considerado, en general, como una enfermedad de la edad adulta (Bozic, Antal et al. 2010). En consistencia con ello, los estudios de muchos laboratorios durante los últimos 25 años han demostrado que, desde el punto de vista molecular, el cáncer es un proceso de múltiples etapas que requiere varios eventos de mutación somática y de selección clonal que producen a lo largo del tiempo variantes en la descendencia celular con propiedades de crecimiento cada vez más agresivas (McFarland, Mirny et al. 2014) (Figura I.1).



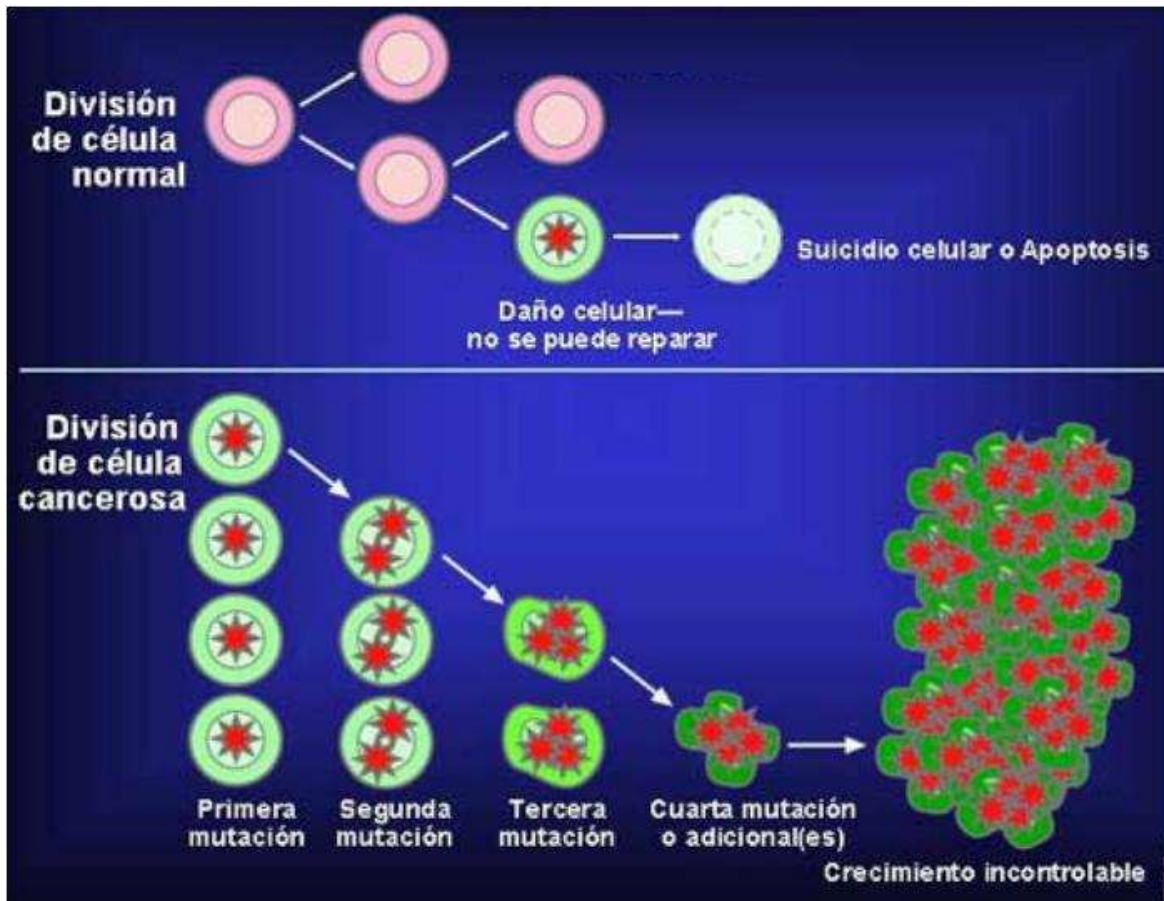


**Figura I.1:** Esquema representativo de la secuencia temporal de la transformación tumoral.

Así es que el análisis genético ha demostrado que el cáncer es un proceso secuencial que implica la acumulación de sucesivas mutaciones en uno o varios genes de distintos tipos (oncogenes, genes supresores, genes de susceptibilidad) y la subsiguiente selección clonal de las células portadoras de las mutaciones, que conduce a que estas células alteren su comportamiento incrementando su capacidad proliferativa y de invasión, y llegando eventualmente a causar la muerte del organismo del que proceden (Greenman, Stephens et al. 2007). Fue en los primeros años de los 90, que estudios realizados en tejidos tumorales popularizaron la visión de que la adquisición secuencial de alteraciones genéticas podían determinar los cambios morfológicos que acompañan la progresión cancerígena (Fearon and Vogelstein 1990).

De esta manera se describió el proceso que conduce al desarrollo de un tumor maligno como "clonalidad secuencial", en el cual comienza en todos los casos con una mutación individual en una sola célula del organismo. Esa mutación inicial contribuye a incrementar la tasa de crecimiento de la célula portadora respecto a las adyacentes, favoreciendo la aparición y selección de un nuevo clon de células con una más elevada capacidad de división (Bodmer 1999). Esta característica denominada clonalidad, indica que todas las células cancerígenas se derivan normalmente de aquella célula primogénita mutada (Nowell 1976). Por otra parte, como consecuencia de su mayor velocidad de división, la tasa de mutación de las células portadoras comienza a ser superior a la de las células normales, provocando así la aparición y acumulación de una serie sucesiva de nuevas mutaciones en su descendencia (Figura I.2) (McFarland, Korolev et al. 2013). La mayoría de dichos cambios genéticos son normalmente deletéreos y provocan la muerte de la célula. Sin embargo, que alguna de las mutaciones pueda ser capaz de mantener la viabilidad celular y conferir a la célula una mayor velocidad proliferativa, por lo que sus

descendientes acabarían siendo mayoritarias en el tumor; también genera, luego, un segundo suceso de clonalidad (Vogelstein, Fearon et al. 1988, Hahn and Weinberg 2002). Este es un proceso que se puede repetir numerosas veces, obteniéndose en cada paso clones celulares con mayor capacidad de división y cuyos procesos de control internos están más alterados (Figura I.2).



**Figura I.2:** Modelo comparativo de la clonalidad de una célula tumoral respecto de una célula normal.

Extraída del *National Cancer Institute*.

En conjunto todos estos procesos son suficientes para llegar a causar la muerte del paciente en el caso de cánceres hematológicos; sin embargo los tumores sólidos requieren de un proceso invasivo posterior para llegar a ser mortales. En concreto, esta mecánica de clonalidad y diseminación determina que en tumores sólidos haya dos etapas bien

diferenciadas. La primera puede durar años y comprende desde la mutación inicial, hasta que se inicia la neovascularización (angiogénesis); y la segunda etapa, mucho más rápida va desde dicha vascularización hasta las etapas metastásicas finales de desarrollo del proceso tumoral (Schedin and Elias 2004).

Sin embargo, hace pocos años este concepto de "clonalidad secuencial" comenzó a ser desafiado por la observación de que tumores individuales muestran gran heterogeneidad en sus patrones de: alteraciones genéticas, cambios epigenéticos y expresión génica, incluso en grupos homogéneos histológicos (Feinberg, Ohlsson et al. 2006). Sumado a esto, el hecho de que los fenotipos malignos puedan ser mantenidos únicamente por una pequeña subpoblación de células con propiedades de células pluripotentes (Pardal, Clarke et al. 2003, Singh, Hawkins et al. 2004), se opone al hecho de que la heterogeneidad tumoral sea consecuencia de la adquisición de una simple mutación. Más aún, la noción de que los estadios cancerígenos tempranos sean sistemáticamente menos agresivos que los tardíos también está siendo discutida, debido a que la identificación de los perfiles de expresión génica en los estadios tempranos es similar a la de eventos cancerígenos metastáticos (Schedin and Elias 2004). Por todo ello, en la actualidad es claro que existen múltiples mecanismos por los que las células pueden progresar en la carcinogénesis; los cuales dependen más en la acumulación y cooperación funcional de cambios entre la genética y la epigenética que en el orden de su aparición (Sadikovic, Al-Romaih et al. 2008).

Por otro lado, la proliferación celular en eucariotas superiores está finamente regulada por diferentes puntos de control (*checkpoints*) y sólo cuando más de uno de estos controles se ven afectados se desarrollan tumores (Vogelstein and Kinzler 2004). A diferencia de otras enfermedades como la fibrosis quística o la distrofia muscular, el cáncer no se produce por mutaciones en un solo gen, sino en más de uno. Entre los genes más frecuentemente mutados en cáncer se encuentran los oncogenes, los genes supresores tumorales y los genes asociados con la estabilidad genómica (Vogelstein and Kinzler 2004).

De esta manera, el campo de estudio de las modificaciones epigenéticas de la cromatina en la generación de cáncer comenzó a tomar un impulso muy importante. Ya que, como hemos mencionado, la generación de cáncer es más que una serie de eventos que generan mutaciones, los cuales, en realidad, son la expresión final de los cambios

irreversibles que facilitan el proceso de progresión tumoral (Herceg and Hainaut 2007). Este nuevo enfoque considera las etapas tempranas del desarrollo tumoral que se presentan como modificaciones epigenéticas del genoma. Desde los cambios en la organización de los dominios cromatínicos hasta la generación de estructuras cromatínicas más cerradas y/o metilaciones aberrantes en regiones de control de los genes, y estos procesos son los primeros eventos durante el desarrollo carcinogénico (Sadikovic, Al-Romaih et al. 2008).

El término "epigenético" define todos los cambios heredables en la expresión génica y la estructura de la cromatina que no se encuentran codificados en la secuencia del ADN pero que no contribuyen a cambios en la secuencia génica. Por ello, la metilación del ADN y las modificaciones de histonas son mecanismos epigenéticos heredables y esenciales para el correcto mantenimiento de la actividad génica estable de una generación celular a la otra (Jaenisch and Bird 2003, Feinberg, Ohlsson et al. 2006). Estos cambios hereditarios son propagados como cambios químicos en las bases de citosinas conocidos como metilación del ADN. La regulación de la cromatina compacta y la accesibilidad al ADN a través de estas señales químicas aseguran las respuestas genómicas apropiadas durante los distintos estados del desarrollo y tipos de tejidos (Bernstein, Meissner et al. 2007). La disrupción de cualquiera de estos mecanismos epigenéticos lleva a una inapropiada expresión génica, resultando en la progresión tumoral u otras enfermedades epigenéticas (Jones and Baylin 2002, Egger, Liang et al. 2004, Feinberg and Tycko 2004).

Así es que la metilación del ADN constituye un importantísimo mecanismo epigenético de regulación de la expresión génica, debido a su interacción con los mecanismos que modifican la estructura de la cromatina. El mantenimiento de los patrones de metilación explica también que las modificaciones epigenéticas sean heredadas establemente tras la replicación del ADN (Bird 2002). Además, como ya se ha mencionado, la metilación tiene importantes implicaciones biológicas, y por tanto la alteración de los procesos normales de metilación de la cromatina puede perturbar procesos fisiológicos importantes. En primer lugar, por ser un mecanismo fundamental en el silenciamiento de retrovirus endógenos y en la inmovilización de transposones y ADN satélite; las alteraciones en la metilación de estos elementos puede provocar numerosas anomalías genéticas. Además, la metilación es la base molecular de los fenómenos de impronta genómica (*imprinting*), y es un mecanismo fundamental en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo embrionario. De hecho, el embrión

sufre una onda de desmetilación genómica global en la fase de mórula de 8 células, seguida por la remetilación gradual que vuelve a fijar los patrones de metilación en la fase de blastocisto. También la inactivación del cromosoma X en mujeres es un proceso básicamente controlado por procesos de metilación, acetilación y silenciamiento. Por tanto, cada vez está más claro que la desregulación de las modificaciones epigenéticas de la cromatina es la base de algunas enfermedades humanas (Sadikovic, Al-Romaih et al. 2008). El papel de la metilación en cáncer cobra cada vez más importancia (Ehrlich 2002), ya que se ha visto que muchos tipos de tumores tienen alteraciones importantes en los procesos de metilación de la cromatina:

- la desaminación de citosinas metiladas (debida habitualmente a la acción de una citidín-desaminasa o por desaminación hidrolítica espontánea) provoca un cambio de Citosina por Timidina, haciendo que los dinucleótidos CpG metilados sean puntos calientes (*hotspots*) para la generación de mutaciones de este tipo. De hecho, se ha estimado que el 30% de las mutaciones encontradas en tumores en el gen *TP53* son transiciones C-T que tienen lugar dentro de dinucleótidos CpG (Rideout, Coetzee et al. 1990). Por otro lado en la regiones codificantes del gen de la proteína de Retinoblastoma (pRb) y en el de la proteína de susceptibilidad de cáncer de mama de tipo 1 (*Breast cancer type 1 susceptibility protein*, *BRCA1*) se observa metilación de islas CpG prevalentes, incluidos los hotspots mutacionales (Rodenhiser, Chakraborty et al. 1996, Mancini, Singh et al. 1997).
- se ha comprobado que durante el proceso de iniciación tumoral hay una aberrante hipometilación global del genoma en la célula pre-maligna, lo que provoca un aumento en la inestabilidad genómica y la aparición de anomalías cromosómicas (Tuck-Muller, Narayan et al. 2000). Además, algunos oncogenes concretos son activados en algunos tumores por desmetilación de sus promotores, por ejemplo H-RAS (Feinberg and Vogelstein 1983), BORIS/CTCF (Woloszynska-Read, James et al. 2007), FGFR1 (Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1) (Goldstein, Meller et al. 2007), c-MYC (Tsukamoto, Morita et al. 1992).

- al mismo tiempo, la hipermetilación puntual de algunos genes supresores tumorales, con el consiguiente silenciamiento y pérdida de función, es un mecanismo muy frecuente de generación de distintos tipos de cáncer. Por ejemplo, el gen *Rb* está frecuentemente metilado en un tipo de tumores llamados retinoblastomas esporádicos. También es frecuente la hipermetilación y, el consecuente, silenciamiento del gen supresor tumoral *INK4* en varios tipos de tumores; la hipermetilación del gen *VHL* (Von Hippel-Lindau) en 20% de los carcinomas de células renales esporádicos. Se estima que en tejido tumoral hasta un 10% de las islas CpG están metiladas, en contraste con células normales en las que este porcentaje es mucho más bajo. En conjunto, estos datos sugieren que la metilación es un mecanismo muy importante para mantener la estabilidad del genoma (Jones and Baylin 2002).
- por su parte, algunos complejos con actividad modificadora de la cromatina se han asociado también con el desarrollo de cáncer (Wolffe 2001). El co-activador transcripcional CBP (Proteína de Unión a CREB) que funciona como una acetilasa de histonas aumenta su actividad acetilasa en pacientes con leucemia mieloide aguda (Santos-Rosa and Caldas 2005). Además, otro co-activador transcripcional con actividad acetilasa de histonas, la proteína p300, está mutada en cáncer de mama y colorrectal, y delecionada en el 80% de los glioblastomas (un tipo de tumor cerebral) (Gayther, Batley et al. 2000).

Durante la última década el conjunto de todos estos trabajos, de muchos laboratorios independientes, ha permitido llegar a importantes conclusiones relativas a la relación entre los productos de los diversos genes tumorales y los componentes de las distintas vías de transducción de señales celulares. El fundamento teórico que resume el nivel de conocimiento actual sobre este tema se puede concretar en dos puntos fundamentales:

- Los productos de oncogenes y genes supresores son componentes de redes de señalización conservadas a lo largo de la evolución que controlan la proliferación, la diferenciación o la muerte celular.
- La mutación de genes en tumores ocasiona redes de señalización alteradas que eventualmente son responsables del desarrollo tumoral. Las mutaciones de

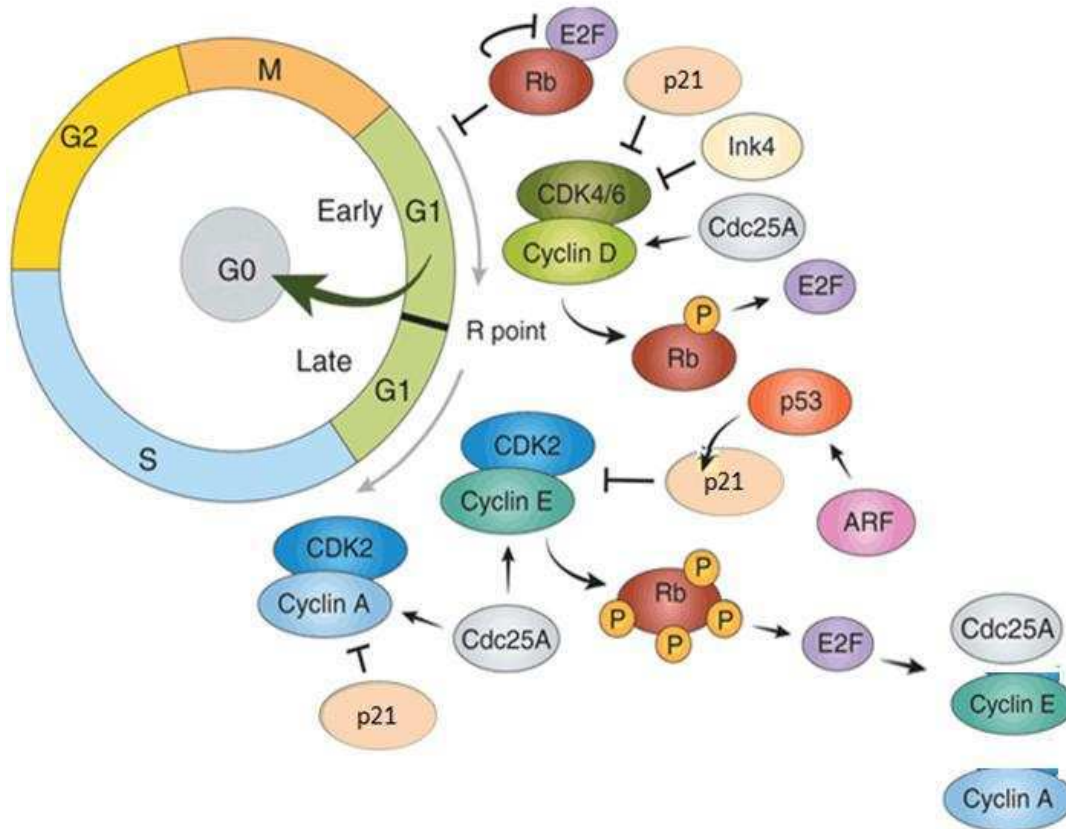
oncogenes y genes supresores provocan, respectivamente, ganancia o pérdida de función en componentes de las vías de señalización provocando así la correspondiente hiperactivación o desactivación de las resultantes señales celulares.

Desde el punto de vista de la oncogénesis, determinadas clases de proteínas y de vías de señalización parecen ser más frecuentemente mutadas que otras (McFarland, Korolev et al. 2013). El cáncer es el resultado de una acumulación aditiva y sucesiva de mutaciones en proto-oncogenes y genes supresores de tumores que afectan al crecimiento celular, a la diferenciación y a la supervivencia. Los estudios iniciales identificaron estos genes y sus funciones como partícipes de vías específicas de señalización, contribuyendo cada una de estas rutas al fenotipo final del cáncer (algunos ejemplos son: la vía de Ras dirigiendo la proliferación incontrolada; la vía de Retinoblastoma (Rb) alterando el ciclo celular; la vía de p53 afectando la apoptosis). Más recientemente, a medida que vamos comprendiendo la complejidad de estas vías, vemos que las distintas rutas se cruzan en diversos puntos concretos, de modo que no pueden considerarse rutas de señalización aisladas. De hecho, estas vías de señalización requieren unas de otras para poder ir alcanzando los distintos pasos que conlleva la evolución del cáncer (Pleasant, Cheetham et al. 2010). Con todo ello, la tumorigénesis se entiende como un proceso gradual y progresivo de cambios fisiológicos (resultantes de alteraciones genéticas), de modo que en cada paso se produce una selección clonal que va dirigiendo la transformación de las células normales en altamente malignas.

Dos de las principales y mejor descritas vías de señalización asociadas con el cáncer son las reguladas por los supresores tumorales p53 y pRb, ya que estos factores pueden actuar negativamente en la regulación de la transición de la fase G1 a S. De hecho estas vías son blanco de potentes oncogenes virales, ya que su inhibición simultánea es suficiente para causar la transformación tumoral (Levine 2009).

Ha sido ampliamente reportado que las vías de señalización de p53 y pRb no sólo son muy importantes en el cáncer sino que están altamente relacionadas. pRb afecta principalmente el control del crecimiento celular como un regulador transcripcional de la familia de factores de transcripción E2F. Contrariamente, p53 es un factor de transcripción respondedor a distintos tipos de estrés que contrarresta la proliferación mediante la

activación de genes involucrados en diferentes aspectos del destino celular, como ser la apoptosis y el arresto celular (Sarkar, Julicher et al. 2000, Vogelstein and Kinzler 2004) (Figura I.3).



**Figura I.3:** Modelo de la regulación del ciclo celular por los factores supresores tumorales p53 y pRb. Adaptado de (Strauss, Hamerlik et al. 2012).

Más claro aún es el ejemplo que aportan los virus oncogénicos a ADN. El virus SV40 es oncogénico a través del antígeno T (*large T antigen*), el cual es capaz de inhibir la actividad de pRb y de p53, en este caso por la formación de complejos que hacen que p53 sea incapaz de unirse al ADN e inducir la transcripción. Los adenovirus oncogénicos transcriben entre sus genes tempranos a E1A que inhibe a pRb y E1B 55-kDa que inhibe a p53. Los virus oncogénicos de papiloma humano como HPV-16 y HPV-18 producen la inactivación de pRb mediante la proteína E7 y la inhibición de p53 vía E6. Es decir, que una estrategia de los virus oncogénicos a ADN es inducir la proliferación mediante la inhibición de pRb y paralelamente también inhibiendo la respuesta de p53 por la formación de complejos con estos antígenos tumorales (Levine and Oren 2009).



## 2. Supresores Tumorales y Oncogenes

Como se mencionó anteriormente, dentro del amplio número de genes que regulan la transducción de señales y la proliferación celular se conocen dos grupos que participan en la progresión tumoral: los proto-oncogenes y los genes supresores de tumores. Las mutaciones en los primeros son genéticamente dominantes, convirtiéndolos en oncogenes y resultando en una ganancia de la actividad celular de su proteína producto que incrementa la posibilidad de iniciar y desarrollar que una célula normal se convierta en una célula tumoral (Vogelstein and Kinzler 2004). Las alteraciones en los genes supresores de tumores son recesivas y la evolución cancerosa requiere de una pérdida de actividad o función de sus proteínas producto.

Principalmente los supresores tumorales poseen la capacidad de alertar a la maquinaria celular sobre potenciales daños o funcionamientos anómalos celulares que puedan terminar en carcinogénesis (Sherr 2004). Ante esta alerta, diferentes mecanismos pueden llevar a la célula a distintos tipos de arresto del ciclo celular o incluso a la inducción de la muerte celular. Por definición la inhibición de la función de estos supresores tumorales causa la predisposición al desarrollo de cáncer. Es por ello, que estos supresores tumorales son frecuentemente blanco de mutaciones para ser inactivados en las células tumorales y/o se encuentran inhibidos por la interacción con otras proteínas (Sherr 2004).

La caracterización bioquímica y funcional de las proteínas producto de oncogenes y genes supresores, llevada a cabo por múltiples laboratorios durante los últimos 20 años, ha permitido constatar que su potencial tumorigénico se basa en que todas ellas codifican para los componentes celulares que gobiernan las vías de señalización celular, cuya desregulación a cualquier nivel puede provocar una proliferación descontrolada y, eventualmente, el desarrollo tumoral. Las proteínas implicadas en oncogénesis participan en numerosas funciones celulares distintas, localizadas en una gran diversidad de compartimentos subcelulares, lo que indica que pueden participar en el control del crecimiento celular a distintos niveles o puntos de vías de señalización (Stratton, Campbell et al. 2009). Así, muchas de estas oncoproteínas son versiones alteradas de factores de crecimiento o de sus receptores, implicando que la regulación del comportamiento celular se realiza ya desde las etapas más tempranas de los procesos de señalización. El hecho de

que un gran número de estas proteínas sean proteína quinasas enfatiza la importancia de los procesos de fosforilación en la regulación de la función proteica y el control de la proliferación celular. Además, muchas de las proteínas implicadas en el control del crecimiento celular están relacionadas entre sí en secuencia y función, ya que están codificadas por miembros de la misma familia de genes con un origen evolutivo común y pueden ser parcialmente redundantes en sus funciones. Por último, un gran número de oncoproteínas son nucleares y participan en eventos más tardíos de la regulación génica como son los procesos de control transcripcional, lo que pone de manifiesto que el comportamiento de la célula es un proceso altamente controlado (Vogelstein and Kinzler 2004).

Comentamos a continuación los aspectos funcionales de alguno de los grupos más significativos de proteínas con potencial oncogénico que participan en los mecanismos celulares de transducción de señales desde la superficie hasta el núcleo celular. En resumen, las vías de señalización en que participan los distintos tipos de oncogenes se pueden clasificar en seis grupos:

1. Factores de transcripción
2. Remodeladores de cromatina
3. Factores de crecimiento
4. Receptores de factores de crecimiento
5. Transductores de señales
6. Reguladores de la apoptosis

Las señales iniciadas en la superficie celular tras la activación de los receptores de factores de crecimiento y citoquinas deben ser transducidas a través del citoplasma hasta llegar al núcleo, donde regulan la transcripción de genes (Pawson 1993). Así, la represión y activación de la transcripción de genes es esencial para dar la respuesta pertinente a las señales que inciden en la célula. Es, por ello, lógico pensar que determinados factores de transcripción ejerzan papeles clave en la regulación de procesos de proliferación celular, inducción de apoptosis y/o reparación del ADN, cuya alteración está asociada a los procesos tumorales (Latchman 1997, Brivanlou and Darnell 2002).

Los factores de transcripción son proteínas que, en respuesta a señales citoplasmáticas, son capaces de regular la expresión génica en el núcleo. Su activación oncogénica determina que puedan actuar constitutivamente, sin necesidad de señales externas, estimulando así de manera continuada la síntesis de proteínas implicadas en la promoción del ciclo celular. Esto puede conducir a un crecimiento incontrolado de las células y al crecimiento tumoral (Hartwell and Kastan 1994). Son numerosos los factores de transcripción cuya relevancia ha sido demostrada en cáncer. Entre estas oncoproteínas podríamos citar Myc y Max (Dominguez-Sola and Gautier 2014), Fos (Milde-Langosch 2005), entre otras.

El tipo de lesiones genéticas responsables de activación oncogénica que han sido encontradas en los distintos genes asociados a procesos tumorales es muy variado. Estas lesiones pueden ser consideradas como causa y/o manifestación de la inestabilidad genética esencial que es inherente a la gran mayoría de las células tumorales. Un análisis global de las distintas alteraciones genéticas detectadas a lo largo de los últimos veinte años en los distintos oncogenes y genes supresores identificados permite clasificar estas lesiones derivadas de la inestabilidad genética en tres grandes subgrupos:

- El menos numeroso incluye pequeñas lesiones genéticas que ocurren a nivel de nucleótidos y se manifiestan, por tanto, como pequeños cambios de secuencia asociados a sustituciones, deleciones o inserciones de unos pocos nucleótidos (Knudson 2001).
- Por otro lado, en la mayoría de los cánceres se observan lesiones genéticas de mayor escala que se manifiestan a nivel cromosomal, pudiendo implicar translocaciones, deleciones o amplificaciones de regiones completas de uno o varios cromosomas individuales (Stephens, Greenman et al. 2011).
- El tercero que asume la desregulación de los patrones epigenéticos que llevan a la inducción y propagación de la tumorigénesis (Herceg and Hainaut 2007, Sadikovic, Al-Romaih et al. 2008).

En todos los casos las mutaciones y/o lesiones genéticas y epigenéticas asociadas a distintos tipos de tumores ejercen sus efecto deletéreo en base a la resultante alteración estructural, funcional o de regulación de las proteínas producto de los genes afectados

específicamente por dichas lesiones. Estos efectos nocivos pueden manifestarse como cambios de nivel de expresión génica o variaciones de actividad o regulación de las proteínas en cuestión (ver a continuación).

Como mencionamos, en ocasiones, una simple mutación puntual en un gen (cambio de un solo aminoácido de la proteína codificada) es suficiente para que la proteína resultante adquiera capacidad transformante. El ejemplo más típico de este tipo de activación es el de los oncogenes *ras*, cuyas mutaciones puntuales hacen que las proteínas mutadas resultantes estén constitutivamente activas, enviando señales mitogénicas continuamente. Las mutaciones más comunes del oncogen *ras* son en el codon 12, 13, o 61 que generan las variantes KRAS, HRAS y NRAS respectivamente; las cuales codifican proteínas con actividad unión guanosin nucleótido y que permanecen activas y continuamente transduciendo señales mitogénicas por la unión tirosina-quinasa a serina y treonina-quinasa (Prior, Lewis et al. 2012). La presencia de mutaciones en genes *ras* ha sido detectada en un gran número de procesos tumorales, alcanzando hasta más del 30% del total de tumores humanos. Son especialmente llamativos los casos del cáncer de páncreas, en el que esta cifra sobrepasa el 90%, o los carcinomas de colon y pulmón o la leucemia mieloide, que presentan cifras de mutación de genes *ras* en el 25 - 50% de los casos (Bos 1989, Prior, Lewis et al. 2012). Por otro lado, también se encuentran supresores tumorales con mutaciones puntuales; uno de los más comunes es el factor p53. La inactivación de p53 por estas mutaciones es de las más frecuentes y más tempranamente detectables, llevando a la patogénesis de muchos tipos tumorales como el de cáncer de mama, tumores cerebrales y sarcomas (Malkin, Li et al. 1990). Otro ejemplo de supresores tumorales comúnmente mutados son los genes *BRCA1* y *BRCA2* involucrados en el desarrollo del cáncer de mama con una frecuencia del 10% (Narod and Foulkes 2004).

Las translocaciones cromosómicas ocurren cuando los brazos de dos cromosomas distintos se unen como consecuencia de fenómenos de recombinación no homóloga. Esto puede dar lugar a que dos genes, en principio distales en el genoma, entren en proximidad física de forma que uno de ellos pueda controlar la expresión del otro o incluso que se fusionen dando lugar a un gen híbrido con propiedades oncogénicas (Nambiar, Kari et al. 2008). Aunque en muchos casos las alteraciones cromosómicas que se observan no

muestran una relación consistente con un tipo determinado de cáncer, existen otros casos donde las anomalías genéticas son específicas y están siempre asociadas a un determinado fenotipo tumoral. Las translocaciones que implican a los genes *c-Myc*, *bcl-2* y *tal-1/2* producen una activación del oncogén por medio de una expresión aberrante de los mismos (Al-Kuraya, Novotny et al. 2007). Otros tipos de translocaciones, como en el caso del cromosoma de Filadelfia, provocan la activación oncogénica a través de la producción de proteínas de fusión. Este sería el caso de los genes *BCR/ABL* en la leucemia mieloide crónica (Druker, Talpaz et al. 2001) o de *ews/fli-1* en el sarcoma de Ewing (Bonin, Scamps et al. 1993), entre muchas otras.

Los procesos de amplificación génica resultan de la reduplicación de fragmentos cromosomales de distintos tamaños y son frecuentes en tumores resistentes a los agentes quimioterápicos. Como consecuencia de la amplificación, genes que normalmente están presentes en solamente dos copias por célula pasan a estar presentes en docenas o cientos de copias, en asociación con el desarrollo tumoral. Obviamente, la expresión incrementada de ciertos genes debe conferir una ventaja de crecimiento a las células tumorales, lo que explica la alta frecuencia de los procesos de amplificación génica en tumores. Ejemplos de oncogenes cuya amplificación ha sido detectado en tumores incluyen *c-Myc*, amplificado en algunos casos de osteosarcomas y carcinomas de mama, pulmón y estómago (Gamberi, Benassi et al. 1998); *L-myc*, en carcinoma microcítico de pulmón; *N-myc*, en neuroblastoma y cáncer de pulmón; *c-fos* se encuentra sobre-expresado en numerosos tumores incluyendo carcinomas de mama, osteosarcomas, cancer cervical, cancer de ovario y de pulmón (Gamberi, Benassi et al. 1998, Milde-Langosch 2005).

La pérdida de material genético es un evento muy frecuente en la gran mayoría de formas tumorales dependientes de la inactivación de genes supresores o de genes de susceptibilidad, que están frecuentemente asociados al desarrollo de los síndromes tumorales hereditarios. Es sabido que el carácter recesivo de las mutaciones en estos genes requiere la inactivación de los dos alelos normales presentes en el genoma. Ejemplos de supresores tumorales afectados por deleciones o pérdida alélica incluye mayormente reguladores de la transición de la fase G1 a S del ciclo celular: el gen *RB*, el locus *INK4* y el locus *PTEN* (Wei, Lonardo et al. 1999, Giacinti and Giordano 2006,

Yoshimoto, Cunha et al. 2007). En el caso de pRb son más frecuentes estos grandes rearrreglos estructurales (30% en osteosarcomas) que mutaciones puntuales (menos del 10%) (Wadayama, Toguchida et al. 1994).

Y por último, aparte de los retrovirus transformantes agudos portadores de oncogenes, existen también retrovirus carentes de oncogenes que pueden transformar una célula normal en maligna. Ejemplos de este tipo de virus son el virus de la leucosis aviar (ALV), el virus del tumor mamario de ratón (MMTV) y los virus de leucemia de ratones, ratas, gatos y primates (MuLV, FeLV y GaLV) (Uren, Kool et al. 2005). La transformación por estos virus se debe a que en el proceso de integración vírica algún protooncogén celular puede quedar en proximidad al genoma del virus y verse así afectado por las señales reguladoras del virus. El mecanismo molecular de activación se puede producir al quedar el protooncogén bajo control de los potentes promotores virales o a través de la formación de proteínas híbridas con funcionalidad alterada (Robinson 1982). En este caso es una única célula la que se transforma en un principio, por lo que el desarrollo del tumor es más lento, asemejándose al proceso de transformación celular inducida por un agente carcinógeno. Ejemplos de oncogenes cuya activación por integración retroviral ha sido detectada en modelos animales incluyen *myc*, *erbB*, *Ha-ras*, *Ki-ras*, *myb*, entre otros. En contraste, las inserciones víricas raramente inducen cáncer en seres humanos (Burmeister 2001).

## El "guardián del genoma", el supresor tumoral p53

Curiosamente esta proteína de 53 kDa fue clasificada inicialmente como un nuevo oncogén, pues se hallaron elevados niveles de expresión asociados al antígeno SV40 en células transformadas, mientras que en células normales la proteína p53 era prácticamente indetectable (Lane and Crawford 1979, Linzer, Maltzman et al. 1979). La explicación a esas observaciones se encontró en la forma que p53 ejecuta su respuesta. Para ejercer su función esta proteína forma complejos homo-oligoméricos, de manera que cuando se introduce una forma mutante de p53 en la célula, también puede unirse a estos complejos e inactivarlos actuando como un dominante negativo (Gannon, Greaves et al. 1990, Lane and

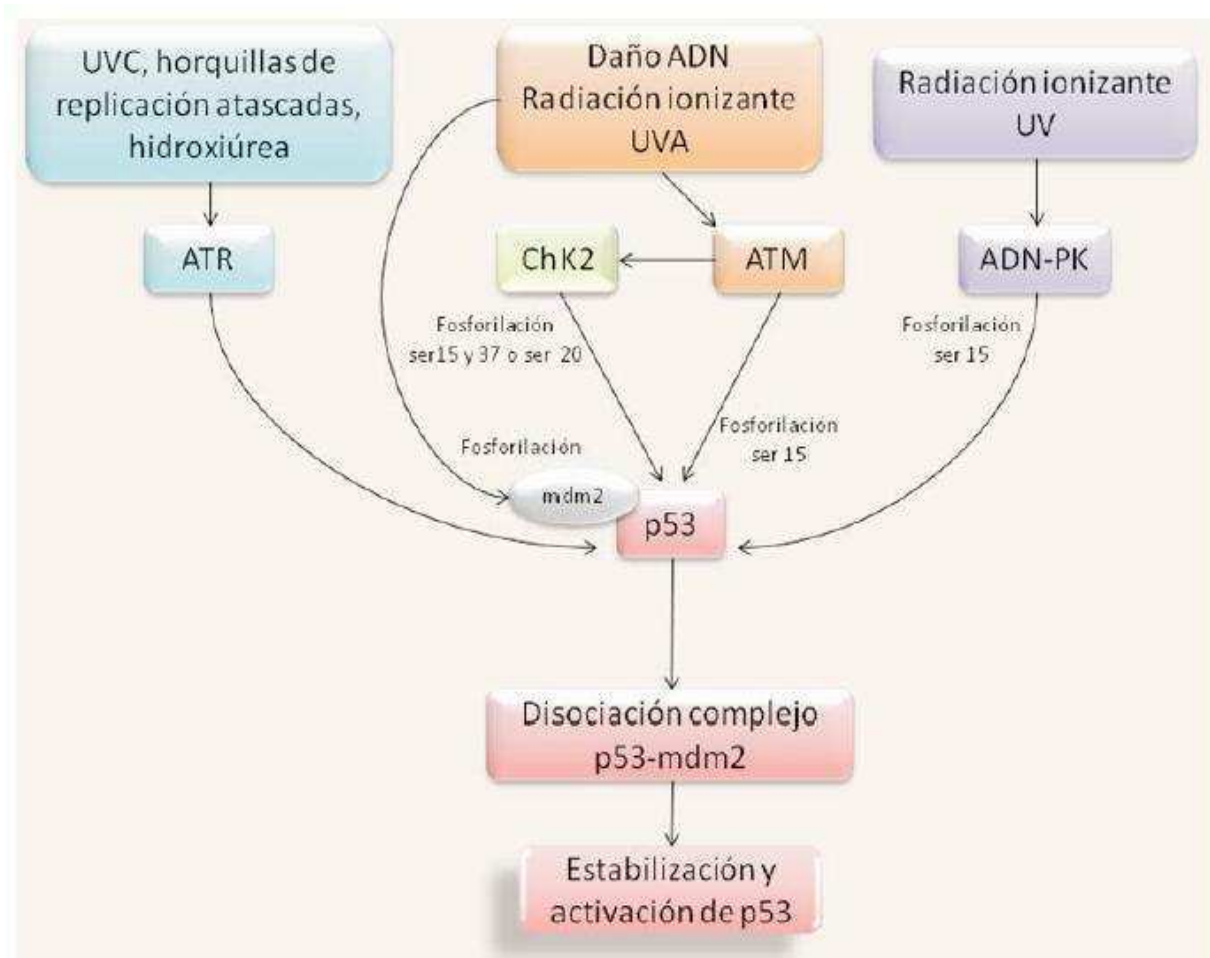
Benchimol 1990). Los posteriores análisis de las funciones de p53 hizo fácil comprender su tipo de función como supresor del desarrollo tumoral (Baker, Fearon et al. 1989, Takahashi, Nau et al. 1989).

Como se mencionó previamente, la vía de señalización de p53 es crítica para la progresión tumoral (Harris and Levine 2005) ya que funciona como nodo para la integración de varias señales sensoriales de estrés, que terminan en una decisión final que puede ser principalmente el arresto del ciclo celular para reparar los daños que ponen en peligro la estabilidad genómica o la inducción de la respuesta apoptótica para eliminar las células dañadas que representan un peligro para la correcta proliferación. Esto hace que el estudio del control normal o patológico de esta vía se lleve a cabo desde distintos puntos: desde las proteínas reguladoras río arriba a la activación del factor de transcripción p53; desde los efectos que produce esa activación a nivel de los genes que induce y, por último, a nivel de la respuesta celular y funcional que esa activación produce. De este modo, p53 en la célula tiene dos grandes funciones: evita que células normales con potencial oncogénico puedan llegar a formar tumores y, en caso de tumores ya formados, aumenta fuertemente la acción de los agentes quimioterapéuticos induciendo apoptosis en las células tumorales (Zilfou and Lowe 2009).

La señalización río arriba de p53 aumenta su nivel proteico y activa su función transcripcional, mientras que los componentes río abajo de p53 son los que ejecutan una apropiada respuesta celular. El mecanismo de acción de p53 está basado en su capacidad de acumularse en el núcleo cuando percibe estímulos como daño al ADN, expresión de oncogenes, estrés oxidativo, hipoxia, depleción de nucleótidos, radiaciones iónicas y otros (Maltzman and Czyzyk 1984, Kuerbitz, Plunkett et al. 1992, Pflaum, Schlosser et al. 2014). Por ello mutaciones en este factor de transcripción han sido encontradas en más del 50% de tumores humanos (Olivier, Eeles et al. 2002, Robles and Harris 2010).

Los diversos agentes físicos como radiaciones ionizantes (rayos  $\gamma$ , rayos X o rayos ultravioleta) o agentes químicos (hipoxia, aumento de la concentración de radicales libres o cambios metabólicos o del pH) producen daño en el ADN (Linke, Clarkin et al. 1996, Levine 1997, Lowe, Cepero et al. 2004). Este daño se puede manifestar como formación de dímeros de timidina, pérdida y/o ganancia de nucleótidos o cambios en la secuencia de

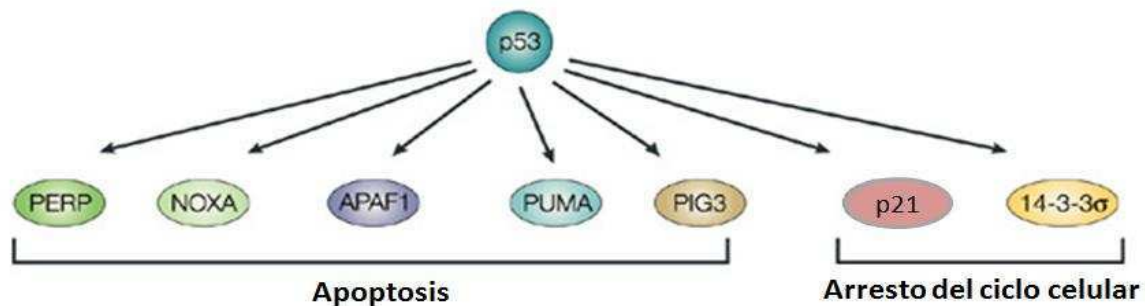
nucleótidos, entre otros. A estas alteraciones la célula responde generando señales de estrés que conducen al aumento en la cantidad de la proteína p53 de manera directamente proporcional a la extensión del daño. Así, cuando la señal inicial se origina por causa de una ruptura de la doble cadena del ADN, se activan proteínas sensoras de daño entre las que se encuentran ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*) o ADN-PK (*DNA-dependent protein kinase*) (Figura I.4). Cuando la proteína p53 es fosforilada en las serinas 15 y 20 y en la treonina 18 del extremo N-terminal, gracias a la actividad kinasa de ATM, ATR, ChK1 (*checkpoint kinase 1*), ChK2 (*checkpoint kinase 2*) o ADN-PK, cambia su conformación espacial, lo que hace que pierda afinidad y se disocie de su principal inhibidor, la proteína Mdm2 (*Murine Doble Minute 2*) (Sancar, Lindsey-Boltz et al. 2004, Lou and Chen 2006).



**Figura I.4:** Modelo de la estabilización de p53 a través de las vías de señalización ATM, ATR y ADN-PK, activadas como consecuencia del daño al ADN. Extraída de (Chuaire-Noack, Sanchez-Corredor et al. 2008).



Una vez que p53 se encuentra estable y activo en el núcleo se une a una secuencia de ADN específica en la región promotora de los genes que inducen y adquieren su función transactivando genes blanco como: 14-3-3 $\sigma$  (principalmente involucrado en el arresto celular en la fase G2), y p21(un potente inhibidor de los complejos ciclinaD/CDK4, ciclinaE/CDK2 y ciclinaA/CDK2) (Kuerbitz, Plunkett et al. 1992, Dulic, Kaufmann et al. 1994); bloqueando, de esta manera, la progresión del ciclo celular en la fase G1. Además de esta función, p53 es un potente inductor de la apoptosis celular transactivando una serie de genes pro-apoptóticos entre los que se encuentran *Bax*, *Pig3*, *DR5*, *PUMA*, *NOXA*, *TP53INP1*, o *APAF-1* (Ladelfa, Toledo et al. 2011) (Figura I.5). Asimismo, p53 es capaz de reprimir la expresión del gen anti-apoptótico *bcl-2*. Debido a su multiplicidad de funciones en la célula, la eliminación de p53 puede tener efectos muy perjudiciales, provocando que las células tumorales no sufran apoptosis a pesar de presentar alteraciones serias en su ADN.



**Figura I.5:** Esquema de las funciones mediadas a través de los genes transcripcionalmente activados por el supresor tumoral p53. Adaptado de (Patel, Loboda et al. 2004).

Más recientemente se ha estudiado la relación entre p53 y los metabolitos derivados del oxígeno. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son constantemente producidas durante el metabolismo normal y en bajas cantidades pueden ser pro-proliferativas, sin embargo, en excesos pueden dañar al ADN y a las proteínas que contribuyen al envejecimiento, enfermedades cardíacas, cáncer y otras patologías (Essick and Sam 2010). Las células utilizan distintas rutas metabólicas para eliminar o modular la cantidad de ROS, y facilitar ciertas respuestas como la apoptosis. Mientras que la respuesta apoptótica de p53 está relacionada con el incremento de ROS, expresiones basales de p53 dirige la

expresión de un número de antioxidantes que limitan el estrés oxidativo (Budanov, Lee et al. 2010, Ladelfa, Toledo et al. 2011, Pani and Galeotti 2011).

Ratones *knockout* para p53 (p53<sup>-/-</sup>) evidencian una gran susceptibilidad al desarrollo de tumores y células con p53 mutada son fuertemente resistentes a tratamientos con drogas utilizadas en quimioterapia (Tchelebi, Ashamalla et al. 2014). Muchas son las publicaciones que indican la falta de respuesta p53 dependiente en células tumorales debido a mutaciones inactivantes o a la falta total de su expresión, pero también existen casos de reducida respuesta p53 dependiente en células p53 *wild type* (p53 sin mutaciones) debido a oncoproteínas virales que inhiben su función, como la proteína E6 del virus del papiloma humano (HPV-E6) (Scheffner, Werness et al. 1990, Werness, Levine et al. 1990, Mantovani and Banks 2001), el adenovirus E1B (Sarnow, Ho et al. 1982) y SV40 *largeT* (Linzer, Maltzman et al. 1979, Pipas and Levine 2001). También ha sido demostrado por este laboratorio y otros grupos, que la potencial desregulación de proteínas celulares como GTSE-1 y Mdm2 pueden inhibir la función de p53 *wild type* de distintos modos: afectando su estabilidad, su actividad transcripcional o su capacidad para entrar eficientemente en el núcleo (Monte, Benetti et al. 2003, Monte, Benetti et al. 2004).

Estos datos indican la complejidad en la respuesta celular dependiente de p53 ante estímulos como el daño al ADN (por ejemplo por agentes quimioterapéuticos), ya que su correcta función depende, en parte, de la correcta regulación de la expresión de proteínas involucradas en distintos procesos celulares; y además que es frecuente que haya una señalización defectuosa río abajo de p53, disminuyendo sustancialmente su efectividad. Por todo ello, es importante elegir una adecuada combinación de drogas para desarrollar estrategias terapéuticas que aseguren la correcta respuesta de p53 (Brown, Lain et al. 2009).

## **El oncogen Mdm2 y su antagonista el supresor tumoral p14ARF**

p53 es una proteína de vida corta (Blagosklonny 1997) y sólo se acumula en el núcleo cuando la célula sensa algunos de los estrés previamente mencionados (Giaccia and Kastan 1998). Como ya hemos mencionado, cuando p53 se encuentra acumulado, se

estabiliza y activa transcripcionalmente a varios genes; uno de los primeros genes que hay que considerar es su propio regulador negativo Mdm2. Mdm2 es una E3 ubiquitina-ligasa, y es la enzima involucrada en la "marcación" de p53 (Honda, Tanaka et al. 1997). Tal como mencionábamos, los niveles de la proteína p53 dependen principalmente de la velocidad de degradación, más que de la velocidad a la que se traduce proteína p53 *de novo*. Esta degradación se regula mediante mecanismos post-traduccionales dependientes de la vía ubiquitina/proteosoma (Jones, Roe et al. 1995, Haupt, Maya et al. 1997). Así es que Mdm2 es quien, en condiciones de no estrés: por un lado, interacciona con el extremo carboxilo terminal de p53 reprimiendo su dominio de transactivación (Kussie, Gorina et al. 1996); y además, ubiquitina a p53 ("marca" la proteína con varias copias del pequeño péptido ubiquitina) para que sea identificada por la maquinaria de degradación del proteosoma (Sionov and Haupt 1999).

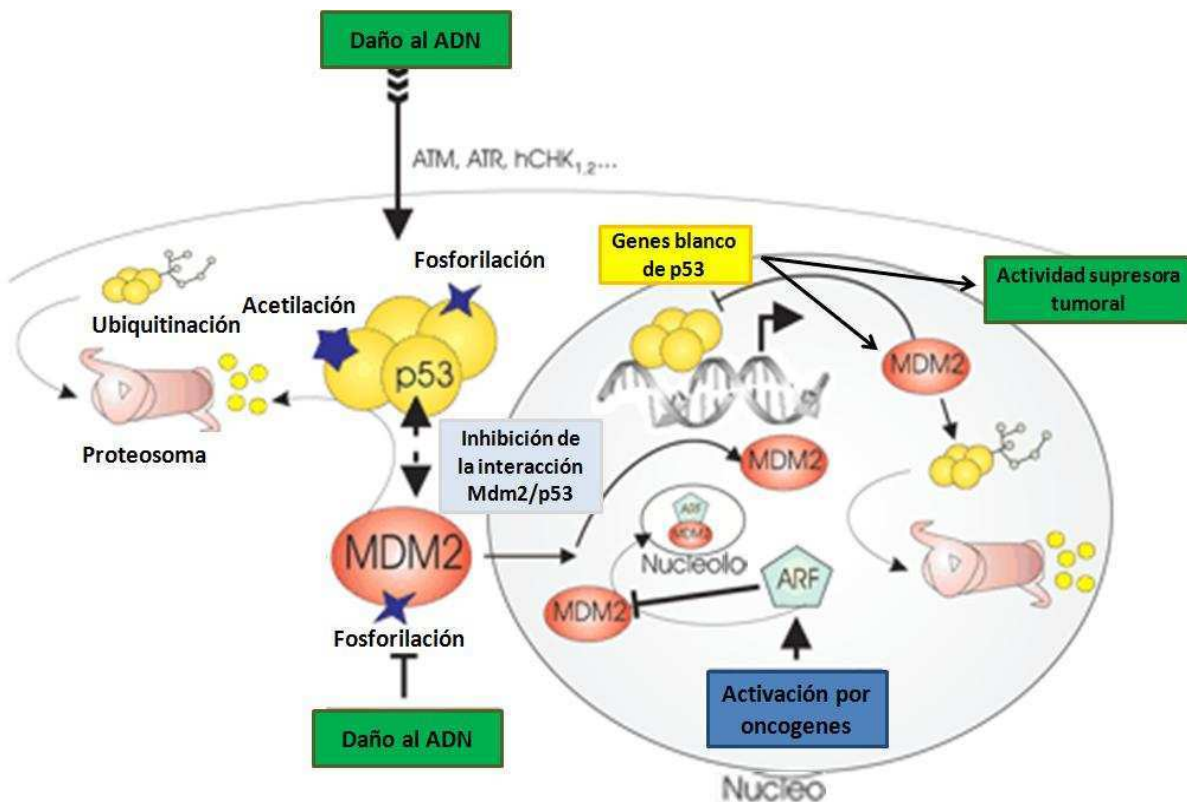
Se ha demostrado que varios tipos de tumores humanos presentan aumentado los niveles proteicos de Mdm2, incluyendo sarcomas de tejidos blandos y osteosarcomas, así como tumores de mama (Oliner, Kinzler et al. 1992, Momand, Jung et al. 1998, Wade, Li et al. 2013). Más aún la sobreexpresión de Mdm2 en cooperación con el oncogen *ras*, promueve la transformación de fibroblastos primarias de roedor; y además se observó la formación de tumores en ratones desnudos (Fakharzadeh, Trusko et al. 1991). El homólogo humano de esta proteína se identificó más tarde y algunas veces se lo llama Hdm2 (*human Mouse double minute 2 homolog*).

En condiciones de estrés la función de Mdm2 puede ser bloqueada por fosforilación, eventos de interacción proteica y/o aumento de su degradación; logrando, de esta manera, la inducción de p53 que activa el proceso de muerte programada (apoptosis) en la célula afectada cuando la reparación no ha sido posible, promoviendo la protección al organismo de la proliferación de células con el ADN dañado. Por otro lado, en el caso de que el daño haya sido reparado, p53 activo inicia la transcripción del gen *mdm2* (Barak, Juven et al. 1993, Juven, Barak et al. 1993, Picksley and Lane 1993) resultando en su auto regulación (Momand, Wu et al. 2000).

Por todo ello, la fosforilación de Mdm2 es esencial para la respuesta de p53 ante radiaciones ionizante. Además, numerosas proteínas con función inhibidora o activadora

pueden actuar sobre Mdm2 para modificar su afinidad por p53 y llevar por tanto a su degradación o bien, a su estabilización (Lee and Lozano 2006).

En cambio, en el caso de la respuesta de p53 ante la expresión de oncogenes depende de la interacción de p14ARF con Mdm2 y su consecuente inhibición (Chen, Marechal et al. 1997, Vousden and Lu 2002, Brown, Lain et al. 2009). La observación de que la proteína p19ARF de ratón podía estabilizar a p53 mediante su interacción con Mdm2 generó una nueva evidencia de la implicancia de Mdm2 en la estabilización de p53 (Pomerantz, Schreiber-Agus et al. 1998, Zhang, Xiong et al. 1998). Posteriores estudios en células murinas indicaron que p19ARF secuestraba a la proteína Mdm2 en el nucléolo, impidiendo que acceda al nucleoplasma donde interaccionaba y ubiquitinaba a p53, de esta manera se lograba mantener a p53 activo por más tiempo para dar paso a los procesos de reparación (Weber, Taylor et al. 1999). Esta evidencia también fue observada tanto en seres humanos (con p14ARF) como en otros mamíferos (Figura I.6).



**Figura I. 6:** Modelo de la estabilización y activación de p53 a través de la vía ARF-mdm2 (hdm2 en humanos), en condiciones normales o situaciones de estrés. Adaptado de (Moll and Petrenko 2003).

Así es que en los mecanismos de acción por los cuales p14ARF inhibe a Mdm2 son dos: en primer lugar, mediante la interacción proteína-proteína (p14ARF-Mdm2) a través del contacto de múltiples dominios en el núcleo siendo suficiente para inhibir la degradación de p53 (Clark, Llanos et al. 2002); y en segundo lugar, mediante la relocalización de Mdm2 del núcleo a los nucléolos, permitiendo la estabilización y transactivación de p53 (Bernardi, Scaglioni et al. 2004, Ozenne, Eymin et al. 2010).

En los seres humanos, la proteína p14ARF es el producto de un transcripto alternativo del locus *INK4*, donde p14ARF comparte dos exones con el transcripto p16INK4a, también un supresor tumoral (ver sección vía pRb) (Collins and Sedivy 2003). Como ya se mencionó, esta respuesta es inducida por la expresión de oncogenes (Ferbeyre, de Stanchina et al. 2000, Pearson, Carbone et al. 2000) y mediada por la activación del factor de transcripción E2F1 que regula su transcripción (Fogal, Gostissa et al. 2000, Eymin, Karayan et al. 2001, Polager and Ginsberg 2008). A través de p14ARF, p53 puede actuar para detener el ciclo celular o para conducir a la célula a un estado senescente. Sin embargo, ni la regulación transcripcional del locus *INK4* ni las vías de señalización asociadas se comprenden aún con exactitud. Entre otras cosas porque, ante la respuesta al daño del ADN, no es claro qué es lo que determina que la célula escoja entre la senescencia o la muerte, ni tampoco cuál es la participación de p14ARF en dicha decisión (Wahl and Carr 2001). Sobre este punto, se ha sugerido que la decisión acerca del destino de la célula depende de factores tales como el tipo de modificación post-traducciona experimentado por p53 en respuesta a diferentes estímulos que modulan la afinidad por las diversas proteínas con las que interactúa, así como el grupo de genes sobre los que ejerce su regulación transcripcional. Parece existir una preferencia de las células normales hacia la senescencia, en comparación con lo que ocurre en las células transformadas, decisión posiblemente relacionada con la extensión del daño del ADN (Wahl and Carr 2001, Ben-Porath and Weinberg 2005, Efeyan and Serrano 2007).

p14ARF es además una proteína a la que se le atribuyen diversas funciones tales como la biogénesis ribosomal, la regulación de la transcripción, la respuesta al daño del ADN, la apoptosis, la autofagia, la supresión tumoral e la inducción de senescencia (Lowe and Sherr 2003, Sherr 2006); y muchas de estas funciones que lleva a cabo son

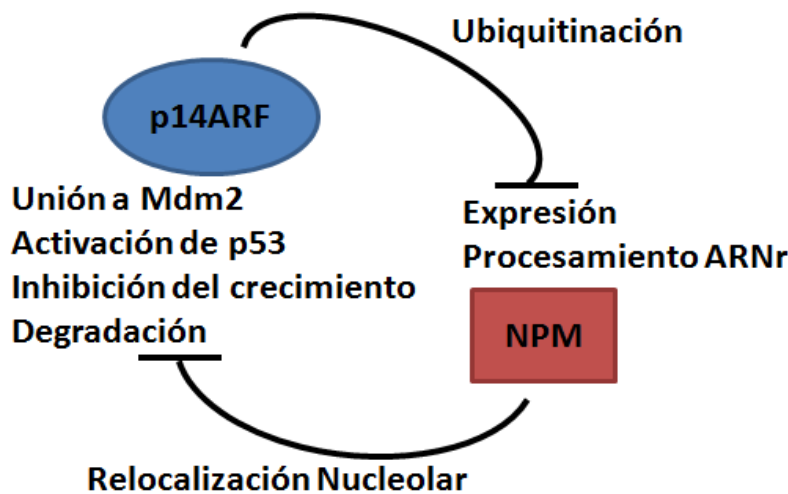
independientes de la interacción con Mdm2 e incluso de la función de p53 (ver a continuación).

Por un lado p14ARF es capaz de activar la señalización de daño al ADN mediante la vía ATM/ATR, evento que parece constituir un requisito fundamental para la efectividad de su función como supresor tumoral independientemente de la actividad de p53. Con posterioridad al daño del ADN, p14ARF gatilla el *checkpoint* en G2 a través de la activación de ambas quinasas ATM y ATR y sus transductores de señal CHK1 y CHK2 lo que lleva a la fosforilación y la estabilización de p53 (Li, Wu et al. 2004, Pauklin, Kristjuhan et al. 2005). Esa estabilización y aumento de la efectividad de la vía de p53 mediante p14ARF puede llevarla a cabo por dos mecanismos diferentes que “comprometen” a ATR: uno por inhibición de la actividad transcripcional del factor anti-apoptótico y antagonista de p53, NF- $\kappa$ B (cuando CHK1 es activado por p14ARF, éste fosforila la treonina 505 de la subunidad RelA de NF- $\kappa$ B) (Rocha, Campbell et al. 2003, Fujioka, Schmidt et al. 2004, Rocha, Garrett et al. 2005, Rocha and Perkins 2005). Por otra parte, p14ARF puede secuestrar proteínas al nucléolo siendo el caso del complejo entre ATR y BRCA1. Dicho complejo contribuye a la activación y estabilización de p53 (Somasundaram, MacLachlan et al. 1999, Rocha, Garrett et al. 2005).

Por último, como mencionamos p14ARF es una proteína predominantemente nucleolar, y allí puede regular el crecimiento celular y la biogénesis ribosomal. p14ARF se encarga de retrasar el procesamiento del precursor del ARN ribosomal (Sugimoto, Kuo et al. 2003, Sharpless 2005) mediante la interacción, ubiquitinación y consecuente degradación de la fosfoproteína nucleolar Nucleofosmina (NPM) (Itahana, Bhat et al. 2003, Bertwistle, Sugimoto et al. 2004). NPM es blanco transcripcional del oncogen c-Myc y se regula positivamente ante señales mitogénicas promoviendo el crecimiento celular y la supervivencia (Feuerstein, Chan et al. 1988, Zeller, Haggerty et al. 2001). Se ha observado en células tumorales la sobre-expresión de esta proteína (Nozawa, Van Belzen et al. 1996) lo que genera resistencia a apoptosis inducida por radiaciones UV o hipoxia (Wu, Chang et al. 2002, Li, Zhang et al. 2004). Recientemente, ha sido reportado que NPM además de ser una proteína asociada al ensamblaje y transporte de los ribosomas, también es un regulador negativo de p14ARF. Se demostró que NPM es un competidor de la asociación de

p14ARF con Mdm2 y que controla su localización porque p14ARF se une a NPM mediante el mismo dominio que median su localización nucleolar, y el dominio de unión a Mdm2 (Korgaonkar, Hagen et al. 2005). Este dato generó un nuevo giro de la regulación de p14ARF, ya que se conocía que era p14ARF quien inhibía a NPM.

Por todo ello, este tipo de co-regulación depende de los niveles de expresión de ambas proteínas, ya que NPM retiene a p14ARF en el nucléolo y en consecuencia bloquea la activación de p53 de manera dosis dependiente. Sólo cuando los niveles de NPM se reducen, entonces p14ARF es capaz de ser liberada del compartimento nucleolar e interactuar con Mdm2 en el núcleo y activar a p53 y su consiguiente actividad inhibitoria del crecimiento celular (Figura I.7) (Korgaonkar, Hagen et al. 2005).



**Figura I. 7:** Modelo de la co-regulación de p14ARF mediada por NPM. Adaptado de (Korgaonkar, Hagen et al. 2005).

Existen también otras pequeñas moléculas activantes de p53, las cuales funcionan causando la liberación de proteínas ribosomales desde el nucléolo al nucleoplasma, dónde unen a Mdm2 e inhiben su función (Lohrum, Ludwig et al. 2003, Zhang, Wolf et al. 2003, Dai and Lu 2004, Dai, Zeng et al. 2004). Éstas moléculas son capaces de compensar cualquier falta de componentes río arriba de la vía de p53, como la inhibición de Mdm2; ya que en células tumorales es frecuente la pérdida de p14ARF (Pflaum, Schlosser et al. 2014). Para ello se encuentran, más específicamente, las proteínas ribosomales tanto de la

subunidad mayor: L5, L11, L23, L26, como de la subunidad menor: S7, S27, and S27a como interactores directos de Mdm2 capaces de inhibir su actividad E3 ubiquitin ligasa (Bhat, Itahana et al. 2004, Dai and Lu 2004, Dai, Zeng et al. 2004, Chen, Zhang et al. 2007, Ofir-Rosenfeld, Boggs et al. 2008, Sun, DeVine et al. 2011, Xiong, Zhao et al. 2011).

Este punto de control, que ha sido recientemente descrito, que involucra la relocalización de estas proteínas ribosomales específicas desde el nucléolo al nucleoplasma (Kim, Leslie et al. 2014), genera que en el núcleo esas proteínas ribosomales regulen además del aumento de la actividad de p53, distintas vías como las que causan la reducción en la actividad de E2F o un aumento en la degradación de c-Myc.

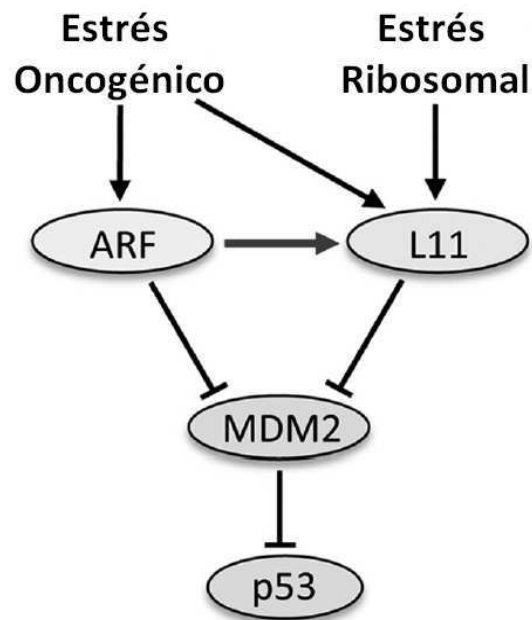
Las dos primeras regulaciones son realizadas a través de la unión e inhibición de la E3 ubiquitina ligasa, Mdm2; promoviendo, por un lado, la estabilización y acumulación de p53 (Lohrum, Ludwig et al. 2003, Zhang, Wolf et al. 2003, Dai and Lu 2004, Dai, Zeng et al. 2004) o por el otro lado, disminuyendo la expresión de E2F1 por la inhibición de su estabilizador Mdm2 (Donati, Brighenti et al. 2011). La última regulación es la disminución del ARN mensajero de c-Myc mediada por la unión de RPL11 a la región 3'-UTR (Challagundla, Sun et al. 2011, Zhou, Hao et al. 2013) y además también es capaz de inhibir la actividad de este oncogen por el bloqueo del reclutamiento de su co-activador a las regiones promotoras de sus genes target (Dai, Sun et al. 2010).

La vía de señalización PR-Mdm2-p53 puede ser gatillado cuando se produce un estrés ribosomal. El estrés ribosomal, también conocido como estrés nucleolar es inducido por perturbaciones de la biogénesis ribosomal como: la inhibición de la síntesis de ARN ribosomal (ARNr) mediante tratamientos con baja dosis de Actinomicina D (Sun, Wang et al. 2010); la inhibición del procesamiento del ARNr por el tratamiento de 5-fluorouracilo (Sun, Dai et al. 2007); o por la delección de factores de la biogénesis ribosomal (Bhat, Itahana et al. 2004).

Recientemente se ha comenzado a estudiar la interacción entre p14ARF y las proteínas ribosomales en la regulación de Mdm2-p53. Una de las más estudiadas es la PR L11, que se asemeja a p14ARF en cuanto al mecanismo de cómo regula a Mdm2 (Xirodimas, Saville et al. 2001, Dai, Shi et al. 2006). Más aún, se encontró que L11 une directamente a p14ARF y coopera incrementando la actividad transcripcional de p53



inducida por p14ARF y el arresto del ciclo celular. Contrariamente, la delección de L11 reduce significativamente la acumulación de p53 mediada por p14ARF. Estos datos demuestran que ambas vías ARF-Mdm2-p53 y L11-Mdm2-p53 a pesar de responder a distintos estímulos están funcionalmente conectadas (Figura I.8) (Dai, Challagundla et al. 2012).



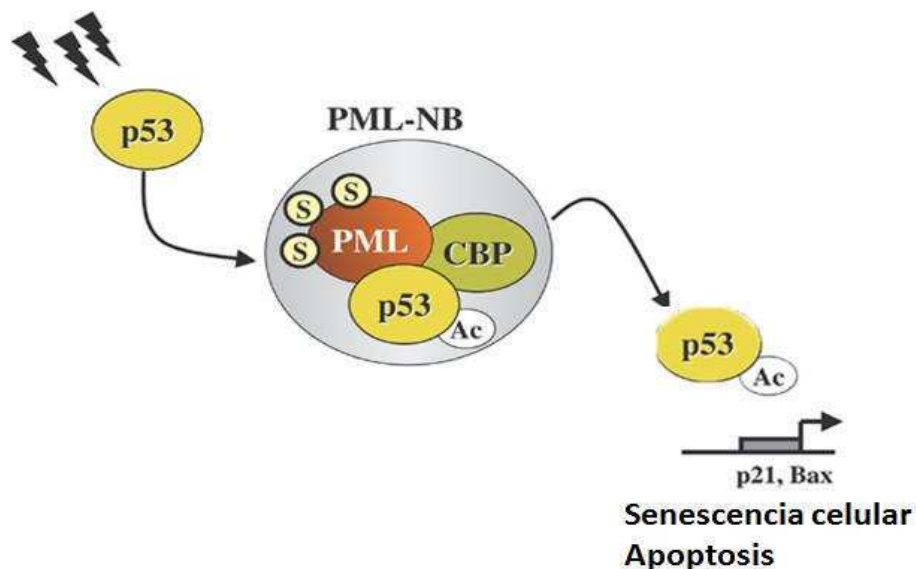
**Figura I. 8:** Modelo de la interacción funcional de las vías ARF-Mdm2-p53 y L11-Mdm2-p53 en respuesta a distintos estímulos. Adaptado de (Dai, Challagundla et al. 2012).

## PML-IV como supresor tumoral

PML-IV (*promyelocytic leukaemia protein 3*) es un supresor tumoral que regula procesos claves como la transcripción, apoptosis, senescencia, respuesta al daño del ADN o resistencia a microorganismos (Salomoni and Pandolfi 2002, Everett, Rechter et al. 2006, Bernardi and Pandolfi 2007, Bernardi, Papa et al. 2008). PML es también responsable de formar los complejos macromoleculares denominados cuerpos nucleares (PML-NBs, *Nuclear Bodies*) (Bernardi and Pandolfi 2007, Lallemand-Breitenbach and de The 2010). Actualmente, se conoce que los NBs son estructuras subnucleares compuestas

principalmente por redes de proteína PML sumoilada, donde PML actúa reclutando otras proteínas (entre ellas varias enzimas modificadoras), para que allí se generen modificaciones post-traduccionales de las proteínas reclutadas y se regulen, de esta forma, sus funciones biológicas (Lallemend-Breitenbach and de The 2010).

De hecho, p53 es reclutada por PML en los NBs para ser fosforilada, deubiquitinada o acetilada y, en consecuencia, activada para gatillar la senescencia o la apoptosis celular (Ferbeyre, de Stanchina et al. 2000, Fogal, Gostissa et al. 2000, Guo, Salomoni et al. 2000, Pearson, Carbone et al. 2000, Bischof, Kirsh et al. 2002, D'Orazi, Cecchinelli et al. 2002). La senescencia es un proceso por el cual se controla la replicación celular. Este proceso está finamente regulado y evita que las células normales se dupliquen infinitas veces (Campisi and d'Adda di Fagagna 2007). La inducción de la senescencia causa un arresto celular irreversible y se activa cuando: las células alcanzan un número determinado de duplicaciones o cuando se activan oncogenes que inducen daños al ADN (Bartkova, Rezaei et al. 2006, Mallette, Gaumont-Leclerc et al. 2007). En las células tumorales este proceso está inhibido, por lo cual estas células se duplican sin este control. Por ejemplo, la activación del oncogén *Ha-ras* en células normales induce senescencia por medio de los supresores tumorales PML-IV y p53. El estímulo proliferativo hace que PML-IV se active y aumente la cantidad de cuerpos nucleares activando a p53 y su consecuente respuesta a la senescencia celular (Pearson, Carbone et al. 2000).



**Figura 1. 7:** Modelo de la modulación de p53mediada por PML. Adaptado de (Bernardi and Pandolfi 2003).

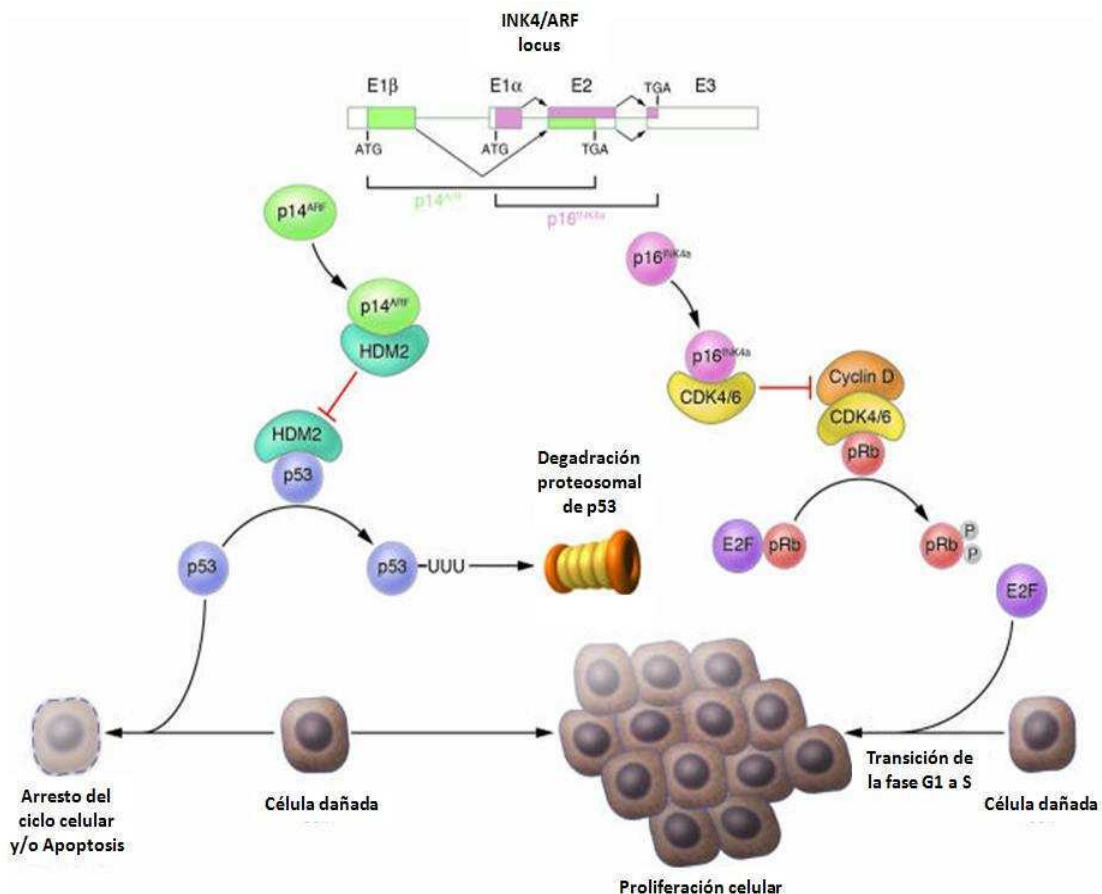
## La vía de pRb y el factor de transcripción E2F

Ya habíamos mencionado que la otra vía central en el control del ciclo celular es la vía de señalización de pRb. *Rb* fue el primer gen supresor tumoral clonado y uno de los más estudiados por su relevancia en el cáncer (Chinnam and Goodrich 2011). La familia de proteínas de retinoblastoma, también conocidas como *pocket proteins*, incluye el producto del gen de susceptibilidad a retinoblastoma (pRb) y las proteínas funcional y estructuralmente relacionadas, p107 y p130 (Grana, Garriga et al. 1998). pRb, de forma similar a p53, funciona como un regulador negativo del crecimiento celular y es un supresor tumoral (Hatakeyama and Weinberg 1995). Ante la llegada de señales mitogénicas, la ciclina D se une a CDK4 (*Cyclin-dependent kinases 4*) o CDK6 (*Cyclin-dependent kinases 6*) y estos complejos con actividad quinasa proceden a fosforilar a pRb, cambiando su estado de fosforilación a lo largo de la regulación del ciclo celular (ver a continuación).

Esta vía está directamente asociada a la regulación de la proliferación mediante el control de una familia de factores de transcripción E2F (Johnson and Schneider-Broussard 1998). E2F1 principalmente, pero también E2F2 y E2F3 inducen la transcripción de genes que codifican para proteínas necesarias para la replicación del ADN, es decir, la entrada en la fase S del ciclo celular (King and Cidlowski 1998). Algunos de los genes inducidos por E2Fs son: ADN pol-II, timidina quinasa, ciclinas A, D y E, el mismo E2F1, entre otros. En condiciones de ausencia de factores de crecimiento, pRb se encuentra en un estado hipofosforilado. En ese estado pRb interacciona y reprime a estos factores E2F, y las células se arrestan en la fase G1 del ciclo celular (Chellappan, Hiebert et al. 1991). Así, el sistema pRb-E2F forma el *checkpoint* en G1, control clave para la prevención de la proliferación celular. Las señales enviadas por los receptores de membrana activados por factores de crecimiento, causan un aumento de las quinasas Cdk4/6 y de su co-factor, la Ciclina D1, complejo que fosforila a pRb. La versión fosforilada de pRb libera a E2F, que mediante su actividad transcripcional regula proteínas necesarias para estimular la transición de la fase G1 a la S y mediante ese mecanismo se induce la proliferación celular (Hatakeyama and Weinberg 1995).

El factor que es esencial y temprano en el paso de la fosforilación de pRb es el supresor tumoral p16INK4a (Ezhevsky, Ho et al. 2001, Ho and Dowdy 2002). Este gen es uno de los cuatro miembros que pertenecen a la familia INK4 de inhibidores de las quinasas ciclina-dependientes (Cdk): p15INK4b, p18INK4c y p19INK4d siendo todos ellos supresores tumorales (Vidal and Koff 2000). Estas proteínas estructuralmente relacionadas se caracterizan por formar complejos con las enzimas Cdk 4 y Cdk 6, induciendo una conformación alostérica que impide su interacción con las Ciclinas de tipo D y en consecuencia previenen la activación de Cdk4/6 (Pavletich 1999). Entonces la función de p16INK4a es mantener a pRb en su estado activo como inhibidor del crecimiento celular .

En esta vía descripta, la Ciclina D1/Cdk4 y el factor de transcripción E2F son oncogenes mientras que pRb y el inhibidor del complejo CiclinaD1/Cdk4, p16INK4a, son supresores tumorales (Polager and Ginsberg 2008). Al igual que sucedía en la vía de p53/Mdm2, donde Mdm2 es el oncogen, mientras que p53 y p14ARF (que procede del mismo locus que p16INK4a) son los supresores (Figura I.8).



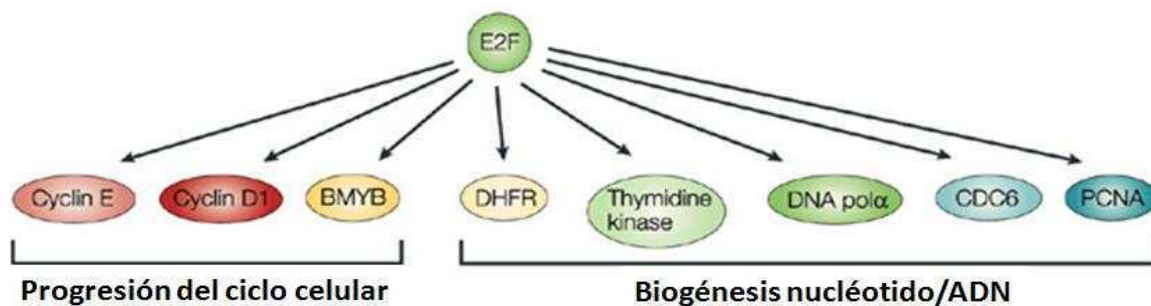
**Figura I.8:** Modelo activación de las vías p53-Mdm2 y pRb-E2F mediante la activación del locus INK4/ARF locus. Adaptado de (Chudnovsky, Khavari et al. 2005).

Por todo ello es que la mayoría de las células tumorales humanas poseen inactivada la vía de pRb, ya sea por mutaciones del supresor tumoral pRb o de sus componentes regulatorios, al igual a lo que mencionamos de p53. La pérdida de pRb priva a las células de un punto de control mitótico importante. Esta disfunción lleva a la desregulación e hiperactivación de los factores E2F dando una proliferación descontrolada en células transformadas (Paggi, Baldi et al. 1996, Wu, Zheng et al. 2009). Además también ocurre la deleción de la región cromosómica que incluye INK4a en una inmensa mayoría de tumores primarios y se encuentra mutado, delecionado o sufre translocaciones en aproximadamente el 75% de las líneas celulares aisladas de tumores (Pasmant, Laurendeau et al. 2007, Sherr 2012).

Los factores de transcripción E2F fueron identificados inicialmente como elementos críticos en el control y la progresión del ciclo celular, ya que regulan genes requeridos para la síntesis de ADN en el límite entre la fase G1/S (DeGregori 2002). La familia de factores de transcripción E2F puede ser dividida en dos subgrupos: E2Fs activadores (E2F1-3) y E2Fs represores (E2F4-8) de la transcripción. Estos factores de transcripción juegan un rol fundamental en la regulación de la proliferación celular y la diferenciación (Dimova and Dyson 2005). Los factores de transcripción E2F-1, -2 y -3 se unen preferentemente a pRb, mientras que E2F-4 y -5 lo hacen mayormente a p130 y p107 (Ewen, Sluss et al. 1993, Kato, Matsushime et al. 1993, Lam and La Thangue 1994, Lam, Morris et al. 1994, Hatakeyama and Weinberg 1995). El complejo resultante pRb/E2F recluta otros co-represores tales como Histonas deacetilasas (HDACs) (Dick and Dyson 2003). pRb que interactúa con numerosas proteínas ejecuta su actividad represora mediante el reclutamiento de complejos de estas HDACs a ciertos genes blancos específicos de los factores E2F y de esta manera reprime su expresión (Harbour and Dean 2001).

Se sabe que E2F1 activa varios genes requeridos para entrar a la fase S y para replicar y sintetizar el ADN (Cam and Dynlacht 2003). De acuerdo con esto, la sobre-expresión de E2F puede hacer pasar por alto el arresto en la fase G1 debido a diferentes estímulos (Kowalik, DeGregori et al. 1995, Schwarz, Bassing et al. 1995, Lukas, Petersen et al. 1996). Estas observaciones son consistentes con su actividad pro-proliferativa y apoyan una actividad pro-oncogénica de E2F1 y, por ello, la desregulación de la vía Rb-E2F ha sido observada en la mayoría de los tumores (Sherr and McCormick 2002).

En general, el incremento de la actividad de E2F está asociado con una proliferación celular inapropiada, que normalmente está contrarrestada por una respuesta pro-apoptótica (Kowalik, DeGregori et al. 1995). Curiosamente, es E2F mismo que en estas condiciones induce la expresión genes que cooperan con la activación de p53 (Polager and Ginsberg 2008). El rol de p53 en la inducción de la apoptosis por hiperactividad de E2F es muy importante. Es por eso que muchos virus oncogénicos son exitosos por su capacidad de inhibir la vía de pRb y de p53 simultáneamente (Levine 2009). Entre los genes inducidos por E2F1 se encuentran *p14ARF*, *PIN1*, *TP53INP1*, *ASPPs* y *p73* (Figura I.9). Además, p14ARF no sólo activa p53 mediante la inhibición de Mdm2, sino que inhibe la actividad transcripcional de E2F mediante la interacción directa con su región C-terminal (Rowland, Denissov et al. 2002).



**Figura I.9:** Esquema de las funciones mediadas a través de los genes transcripcionalmente activados por el factor E2F. Adaptado de (Patel, Loboda et al. 2004).

La expresión de E2F es regulada positivamente ante daños en el ADN (Lin, Lin et al. 2001). La respuesta al daño del ADN mediada por E2F1 podría trabajar en paralelo con la vía mediada por p53 para coordinar respuestas tales como: la regulación de puntos clave del ciclo celular, la reparación del ADN, o el desencadenamiento de la apoptosis (Wu, Zheng et al. 2009). E2F es capaz de unirse y estabilizar a p53 mediante su sitio de unión a la Ciclina A. La Ciclina A normalmente evita que p53 y E2F interactúen, pero ante el daño en el ADN los niveles de la Ciclina A decrece y aumenta la formación del complejo E2F-p53, lo cual induce la apoptosis (Hsieh, Yap et al. 2002, Braithwaite, Del Sal et al. 2006).

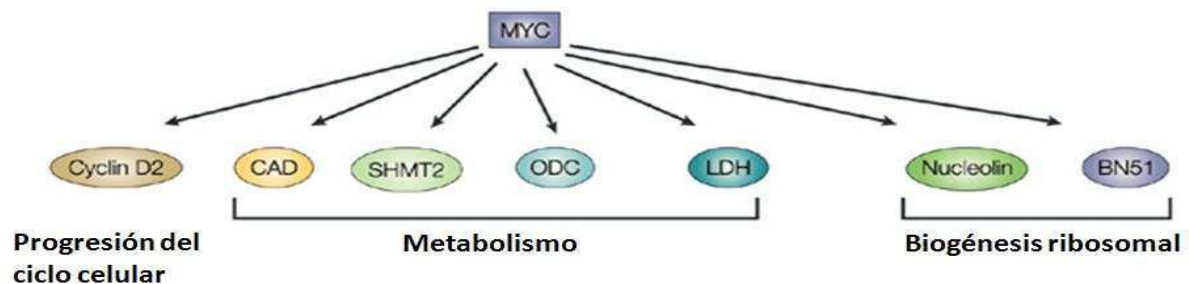
Se ha probado también, que en algunos casos, E2F1 puede inducir la muerte celular independientemente de p53, tal vez debido a que induce genes pro-apoptóticos como p73 (Hsieh, Fredersdorf et al. 1997, Phillips, Bates et al. 1997).

## El oncogen c-Myc

El proto-oncogen c-Myc fue descubierto como el homólogo de v-Myc (de origen retroviral), una proteína capaz de causar leucemias, linfomas, sarcomas, tumores de hígado, de riñón, y otros tumores en pollos (Duesberg and Vogt 1979, Vennstrom, Sheiness et al. 1982). c-Myc humano ha sido identificado como el oncogén más amplificado en una gran variedad de tumores humanos de distinto origen (Patel, Loboda et al. 2004, Beroukhim, Mermel et al. 2010). De hecho, experimentos realizados manipulando la expresión de c-Myc han demostrado que tiene poder transformante en una gran variedad de modelos celulares (Kelly, Cochran et al. 1983, Adams, Harris et al. 1985, Ellwood-Yen, Graeber et al. 2003, Chesi, Robbiani et al. 2008).

c-Myc es un factor de transcripción que actúa como mediador de numerosas señales mitogénicas y está involucrado en los procesos de proliferación celular a través de la formación de complejos heterodiméricos con la proteína Max (Amati, Brooks et al. 1993). Los extremos amino- y carboxi-terminales de c-Myc son esenciales para la actividad transcripcional del complejo, ya que el primero contiene el dominio de activación de la transcripción y el segundo permite la dimerización con Max. La interacción c-Myc-Max puede ser suplantada por complejos alternativos de Max con un grupo de factores de transcripción denominados Mad (Grinberg, Hu et al. 2004). A diferencia de c-Myc-Max, los complejos Mad-Max desempeñan una importante función en procesos de diferenciación. El resultado es la sobre-expresión de la oncoproteína c-Myc, desplazando, de este modo, el equilibrio hacia el complejo c-Myc-Max y, por tanto, dificultando la diferenciación y favoreciendo la proliferación.

El principal mecanismo por el cual c-Myc regula la proliferación celular es por su función como factor transcripcional de respuesta inmediata y temprana de distintos complejos receptores de membrana-ligandos (Kelly, Cochran et al. 1983, Armelin, Armelin et al. 1984). Muchas vías de señalización intracelulares activadas por factores de crecimiento o el microambiente celular (como ser el anclaje celular con la matriz extracelular y los nutrientes o la disponibilidad de los factores de crecimiento) son capaces de activar a c-Myc (Schlosser, Holzel et al. 2005, Eilers and Eisenman 2008, Dang 2012). Consecuentemente, c-Myc regula positivamente la transcripción de cientos de miles de genes involucrados en un amplio rango de funciones biológicas (Patel, Loboda et al. 2004), de los cuales predominan los genes involucrados en los diferentes puntos de control de la proliferación celular como: la biogénesis ribosomal, la síntesis proteica y el metabolismo (Figura I.10) (O'Connell 2003, Dang, Li et al. 2005, Dimova and Dyson 2005, Hong, Kang et al. 2005, Lawlor, Soucek et al. 2006, Liu, Le et al. 2012).



**Figura I.10:** Esquema de las funciones mediadas a través de los genes transcripcionalmente activados por el oncogen c-Myc. Adaptado de (Patel, Loboda et al. 2004).

Entre sus genes blanco está la familia E2F, quienes a su vez inducen la transcripción de más c-Myc promoviendo la progresión del ciclo celular (O'Donnell, Wentzel et al. 2005). c-Myc es uno de los oncogenes más estudiados y está estrechamente vinculado a E2F (Dong, Maddali et al. 2014), ya que c-Myc simultáneamente activa la transcripción de E2F1 y limita su traducción, manteniendo una señal proliferativa controlada (O'Donnell,



Wentzel et al. 2005). Este potente oncogén afecta dramáticamente la actividad de E2F, aparentemente a través de la regulación de la expresión de ciclinas G1 como también de la actividad de CdKs (Holzel, Kohlhuber et al. 2001). De hecho, recientemente fue demostrado que c-Myc es también necesario para permitir la interacción del factor E2F con los promotores de sus propios genes (Leung, Ehmann et al. 2008), sugiriendo un nuevo rol de c-Myc independiente de pRb en la activación de E2F mediante la modulación de su auto-regulación. Además de este efecto de retro-alimentación cruzada, y la inducción de genes por c-Myc que regulan la vía de E2F, ha sido reportado que E2F1 es esencial para la supervivencia de las células que sobre-expresan a c-Myc (Santoni-Rugiu, Duro et al. 2002).

# Familia de proteínas MAGE

---

## 1. Generalidades

El primer miembro de la familia MAGE (*Melanoma Antigen Genes*) fue MageA1, descubierto en 1991 por van der Bruggen y colaboradores mediante estudios en células primarias de melanoma humano, en los cuales se buscaban antígenos específicos tumorales. Este grupo de investigación se basó en la utilización de clones autólogos de linfocitos T citotóxicos (CTLs) aislados en 1980 que estaban dirigidos contra tumores de melanoma. Estos CTLs reconocían un pequeño fragmento de un péptido al que denominaron MZ2-E, el cual era presentado por el complejo de histocompatibilidad mayor de tipo I (MHC I) en la superficie celular de células derivadas de pacientes con melanoma, denominadas MZ2-MEL (Herin, Lemoine et al. 1987). Unos años más tarde se logró aislar un gran número de genes que codificaban para antígenos específicos tumorales (Zeuthen, Dzhandzhugazyan et al. 1998). Fue entonces cuando van der Bruggen generó una librería de cósmidos para transfectar esos antígenos en líneas celulares MZ2-E<sup>-</sup> (sin el antígeno); y con el reconocimiento de esos transfectantes mediante la estimulación de los CTLs específicos del péptido MZ2-E, logró encontrar un fragmento de 2.4kb que transfirió la expresión del antígeno MZ2-E en una alta eficiencia. Este pequeño fragmento fue utilizado como una sonda de hibridación en un Southern Blot. Y de esta manera, se logró aislar a quien fue denominado como Mage1, quién sería luego llamado MageA1 (van der Bruggen, Traversari et al. 1991). Además de la banda de 2.4kb, la sonda hibridó con varias bandas adicionales de diferentes intensidades, sugiriendo que el gen responsable para la producción de antígeno MZ2-E tiene similitudes con la secuencia de otros genes. El Southern Blot confirmó la existencia de una familia de genes. Para esta familia de genes se propuso el nombre MAGE (*Melanoma Antigen Gene*), con *mage-1* refiriéndose al gen que dirige la expresión del antígeno MZ2-E y *mage-2* y *mage-3* para los otros dos genes, que fueron descritos como genes altamente conservados y similares a Mage-1. En esta primera instancia se propuso la posible existencia de otros genes cercanamente relacionados expresados en una baja cantidad en estas células.

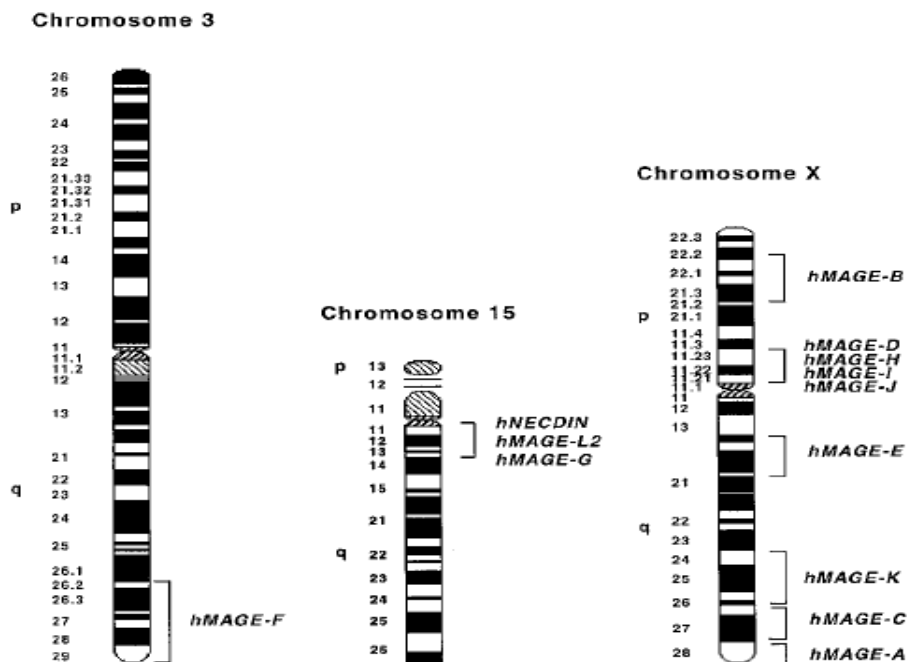
Para evaluar la expresión de Mage-1 en varias células normales y tumorales, van der Bruggen y colaboradores, hibridaron un Northern Blot con una sonda que cubría la mayor parte del tercer exón. Como resultado se obtuvo que 10 de las 14 líneas celulares de melanoma utilizadas en ese trabajo fueron positivas para la expresión de Mage-1, mostrando bandas de diferente intensidad. Además, 2 de 4 muestras de tejidos tumorales de melanoma, incluyendo metástasis en pacientes MZ2, también fueron hibridados con la sonda; como también algunos tumores de otros tipos histológicos también fueron positivos para la marcación. Las células normales que fueron testeadas por RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) se confirmaron como negativas para la expresión de estos 3 genes. A partir de aquel trabajo se concluyó que la familia de genes *mage* es expresada en un gran número de tumores diferentes y no en las células normales. A pesar de estos resultados resultó difícil establecer definitivamente si los antígenos reconocidos *in vitro* en tumores humanos por CTLs autólogos constituían potenciales blancos para el rechazo del sistema inmune *in vivo*. A partir de este descubrimiento, en el que el potencial antígeno involucrado en el rechazo de tumor es compartido por una proporción significativa de tumores humanos y que la habilidad de identificar esos tumores fácilmente en base a la expresión del gen relevante, se creyó la posibilidad de que estas proteínas MAGE podrían tener importantes implicaciones para la inmunoterapia del cáncer (van der Bruggen, Traversari et al. 1991).

Posteriormente, se identificaron 11 nuevos genes similares al gen *mage-1* anteriormente descrito. Para esto se analizaron bibliotecas a partir de la secuencia de Mage-1 y se identificaron 11 genes altamente relacionados. Los 11 genes *mage* encontrados mostraron una identidad que fue desde el 64% al 85% con Mage-1. También se descubrió que la secuencia codificante de los genes *mage*, predicen la misma característica estructural para todas las mismas proteínas MAGE, no obstante, los promotores y los primeros exones de los 12 genes *mage* mostraron una variabilidad considerable (De Plaen, Arden et al. 1994). Se observó que estos 12 genes están localizados en la región Xq28 del cromosoma X (Figura I.11). Este descubrimiento fue realizado cortando el genoma con un par de enzimas de restricción y utilizando sondas que contenían 500 pb de la región codificante de Mage-1, de esta manera se podía observar que la misma sonda reconocía fragmentos de ADN de distintos tamaños. Mediante PCR con *primers* específicos también se pudo demostrar que los 12 genes *mage* están contenidos en

esta región del cromosoma X (Muscatelli, Walker et al. 1995, Rogner, Wilke et al. 1995). Todos estos resultados llevaron a denominar a todos estos genes como integrantes del mismo grupo, el cual fue llamado Mage-A (Lurquin, De Smet et al. 1997).

De la misma manera, fueron descriptos otros dos grupos de genes altamente conservados y similares a los del grupo Mage-A, que fueron denominados como los subgrupos Mage-B y Mage-C (De Plaen, Arden et al. 1994, Muscatelli, Walker et al. 1995, Lucas, De Smet et al. 1998, Pold, Zhou et al. 1999, Lucas, De Plaen et al. 2000, Osterlund, Tohonen et al. 2000). Estos tres subgrupos de genes *mage* pasaron a formar la subfamilia MAGE de tipo I (Lurquin, De Smet et al. 1997).

Hoy en día se han identificado más de 50 proteínas perteneciente a la familia MAGE (Ladelfa, Peche et al. 2012). La clasificación actual divide a las proteínas MAGE en dos subfamilias según su patrón de expresión: MAGE-I y MAGE-II. Los genes de la subfamilia MAGE-I se expresan en tumores de diversos orígenes, aunque también en testículo y placenta, y comprende a los grupos Mage-A, Mage-B y Mage-C (constituidas por 12, 18 y 7 genes, respectivamente) cuyos genes mapean en clusters en distintas regiones en el cromosoma X (locus Xq28, Xp21.3-22.2 y Xq26-27, respectivamente, Figura I.11) (De Plaen, Arden et al. 1994, Oaks, Hanson et al. 1994, Muscatelli, Walker et al. 1995, Lucas, De Smet et al. 1998).



**Figura I.11:** Esquema representativo de la localización cromosómica de los genes *mage-I* y *-II* mostrando cada uno de los subgrupos. Extraído de (Chomez, De Backer et al. 2001).

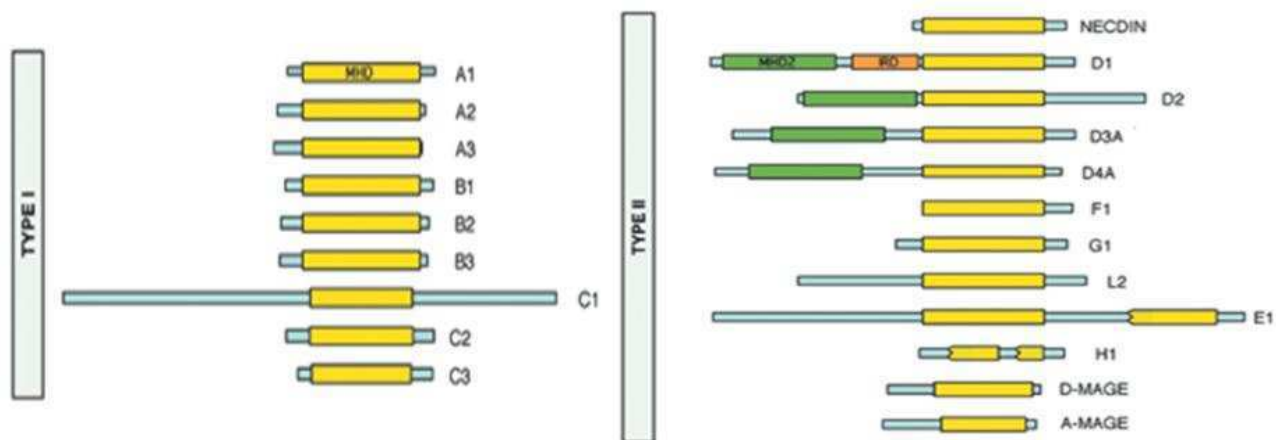
Por sus características pertenecen al grupo de *cancer-testis antigens* (CTA). Los CTAs son genes cuya expresión se encuentra restringida a células germinales y al trofoblasto pero además se expresan de manera aberrante en una amplia variedad de tumores humanos. La mayoría de estos genes localizan en el cromosoma X como familias multigénicas que comparten un *locus* genómico común entre las que se incluye a las familias multigénicas: MAGE, GAGE (*G antigens genes*) y XAGE (*X chromosome antigens genes*), NY-ESO-1, SCP-1 (*small C-terminal domain phosphatase 1*), and SSX (*synovial sarcoma X*). Aunque la función de los CTAs en las células germinales se desconoce, su caracterización representa una posible estrategia para el tratamiento del cáncer, como ser blanco de vacunas antitumorales (Kirkin, Dzhandzhugazyan et al. 2002).

Por otra parte, la subfamilia MAGE-II, se diferencia de los MAGE-I, ya que su expresión es ubicua y no asociada a cáncer, y cuya localización génica no está restringida al cromosoma X. Esta subfamilia está integrada por los subgrupos: Mage-D (4 genes), Mage-E, Mage-F1, Mage-G1, Mage-H1, MAGE-I (2 genes), Mage-K1, Mage-L2 y neclina (Figura I.11) (Chomez, De Backer et al. 2001, Barker and Salehi 2002).

## 2. Estructura proteica de la familia multigénica MAGE

Mediante la comparación de las secuencias de las proteínas codificadas por los genes *mage* se identificó una región de aproximadamente 200 aminoácidos, generalmente cercana al extremo carboxilo de la proteína, la cual se denominó *MAGE Homology Domain* (MHD). Tanto las proteínas MAGE-I como las de tipo MAGE-II comparten este dominio de homología (Barker and Salehi 2002). En general, los MHDs se encuentran altamente conservados entre las distintas proteínas, incluso entre MAGE de tipo I y II. En promedio, los MHDs humanos están conservados a nivel aminoacídico en un 46%. Dentro de cada grupo la conservación del MHD es aún mayor: 75% entre las 4 proteínas del grupo Mage-D humano y 70% entre las 12 proteínas pertenecientes al grupo Mage-A humano (Doyle, Gao et al. 2010).

A pesar de ser una secuencia común y conservada entre los distintos MAGE, se desconoce si el MHD les confiere a las proteínas MAGE alguna función biológica. En algunos casos, el MHD sufre modificaciones post-traduccionales que, por ejemplo, modulan la estabilidad de la proteína de MageA11 (Bai and Wilson 2008). En la figura I.12 se esquematizan algunas proteínas MAGE de las subfamilias I y II. La mayoría de las proteínas de la subfamilia MAGE-I están constituidas por algunos pocos aminoácidos adicionales al MHD (en amarillo). Contrariamente, las proteínas de la subfamilia MAGE-II presentan mayores variaciones en sus extremos carboxi- y amino-terminal, y además, en algunos casos, un MHD adicional menos conservado (denominado MHD2, en verde) (Barker and Salehi 2002). Ciertos genes *mage* presentan variantes transcripcionales, como MageD3, MageD4 y MageA11.



**Figura I.12:** Esquema representativo de las proteínas MAGE-I y -II ejemplificando algunos miembros de cada subgrupo. Extraído de (Barker and Salehi 2002).

## 2.1 Subfamilia MAGE-I

En los últimos años se han obtenido diferentes indicios que sugieren que los MAGE de tipo I muestran propiedades oncogénicas facilitando la supervivencia (confieren resistencia a la apoptosis inducida por agentes quimioterapéuticos, como el paclitaxel, la doxorubicina o el factor necrótico tumoral) y la proliferación de células cancerígenas, como también son capaces de promover la formación de tumores y el proceso metastásico (Miyashiro, Kuo et al. 2001, Cilensek, Yehiely et al. 2002, Kufer, Zippelius et al. 2002, Park, Kong et al. 2002, Duan, Duan et al. 2003). Tal como se mencionó anteriormente, el estudio de las proteínas

MAGE desde su descubrimiento en 1991 se ha centrado en la inmunoterapia tumoral para su utilización como potenciales vacunas anti-Mage; que se ensayan en pacientes oncológicos (Caballero and Chen 2009, Sang, Lian et al. 2011); y además como factor pronóstico y diagnóstico del cáncer ya que son potenciales marcadores de tumores humanos (Park, Kwon et al. 2002, Kwon, Kang et al. 2005, Kim, Kim et al. 2010, Hussein, Gharib et al. 2011, Hussein, Ghareib et al. 2012). Actualmente su estudio también incluye la investigación básica con fines terapéuticos, desarrollando estrategias para estudiar los mecanismos de acción de las proteínas MAGE-I y, así, comprender cómo benefician a las células tumorales y cuáles son los inhibidores de su actividad.

### 2.1.1 Función de proteínas del Grupo Mage-A

Recién en los últimos años se ha iniciado el estudio de las funciones biológicas de las proteínas codificadas por genes *mage* y la asociación con otras proteínas. En este sentido, se ha demostrado que varias proteínas del grupo Mage-A están asociadas a efectos de regulación de la transcripción (Sang, Lian et al. 2011, Ladelfa, Peche et al. 2012) (Tabla I.1):

	<b>Interacción</b>	<b>Función</b>	<b>Cita</b>
<b>MageA1</b>	SKIP y HDAC1	Inhibición transcripcional de Notch1.	Laduron et al, 2004
<b>MageA2</b>	p53 / HDAC3	Represión transcripcional de p53 y sobrevida ante el tratamiento con fármacos.	Monte et al, 2006*
	p53	Inhibición transcripcional de p53.	Marcar et al, 2010
	PML-IV	Inhibición de la senescencia inducida por Ha-ras.	Peche et al, 2012*
<b>MageA3</b>		Acelera la progresión del ciclo celular en respuesta a niveles de FN y FGFR2.	Liu et al, 2008
<b>MageA4</b>	GANKIRIN	Supresión del anclaje independiente del crecimiento celular <i>in vitro</i> .	Nagao et al, 2003
	Miz-1	Inhibición de p21 e inducción de apoptosis.	Sakurai et al, 2004
<b>Mage-As</b>	KAP1	Aumento de la ubiquitinación y degradación de p53.	Yang et al, 2007
<b>MageA11</b>	AR	Activación de la transcripción de AR.	Bai y Wilson, 2008

**Tabla I.1:** Cuadro comparativo de distintos miembros del subgrupo Mage-A, describiendo interactores y funciones de cada uno.

El \* representa los trabajos publicados por nuestro laboratorio. Cuadro adaptado de (Ladelfa, Peche et al. 2012).

- **MageA1** se une a la proteína adaptadora llamada *Ski interacting protein* (SKIP), un regulador transcripcional que conecta la proteína de unión a ADN con proteínas que activan o reprimen la transcripción. Además, se encontró que MageA1 reprime activamente la transcripción uniéndose y reclutando histona deacetilasa 1 (HDAC1). Mediante la unión de SKIP y el reclutamiento de HDAC1, MageA1 puede actuar como un potente represor transcripcional. MageA1 podría participar en el establecimiento de determinados patrones de expresión génica para el crecimiento de células tumorales o la espermatogénesis (Laduron, Deplus et al. 2004). SKIP fue descrito por ser involucrado en la vía de señalización de Notch1. Notch1 es un receptor transmembrana que media las comunicaciones intracelulares y dirige las decisiones de destino celular durante el desarrollo. Los ligandos unidos a Notch1 inducen un clivaje proteolítico intramembrana que libera el dominio intracelular del receptor, Notch1-IC, el cual trasloca al núcleo y regula la expresión de un número de genes. Una de las proteínas de unión a ADN que interactúa con Notch1-IC es el factor promotor de unión C (CBF1) (Fortini and Artavanis-Tsakonas 1994). En ausencia de Notch1-IC, CBF1 inhibe la transcripción uniéndose a SKIP (Zhou, Fujimuro et al. 2000). La represión es liberada por la presencia de Notch1-IC, el cual se une a SKIP y CBF1, desplazando el complejo de represión y activando la transcripción mediante el reclutamiento de histonas acetiltransferasas (Kurooka and Honjo 2000, Zhou, Fujimuro et al. 2000, Kitagawa, Oyama et al. 2001).

- El **MageA4** a diferencia de los efectos pro-proliferativos observados por los otros tipo de Mage-A tiene actividad anti-oncogénica. Esta actividad es mediante su interacción directa con Gankirina, inhibiendo su actividad tumorigénica y, en consecuencia, suprimiendo el anclaje independiente del crecimiento celular *in vitro* aunque en este caso no se observe un efecto inhibitorio de la progresión del ciclo celular o a la apoptosis (Nagao, Higashitsuji et al. 2003). Además, fue reportado que el fragmento carboxi-terminal de MageA4 (MageA4 $\Delta$ N1) induce la muerte celular. Este fragmento C-terminal es capaz de interactuar con Miz-1 (factor transcripcional de p21), ocasionando la inhibición de la expresión de p21 y sensibilizando las células a una respuesta pro-apoptótica. Este fragmento, MageA4 $\Delta$ N1, se genera a partir del MageA4 completo en respuesta a estrés genotóxico (Sakurai, Itoh et al. 2004).



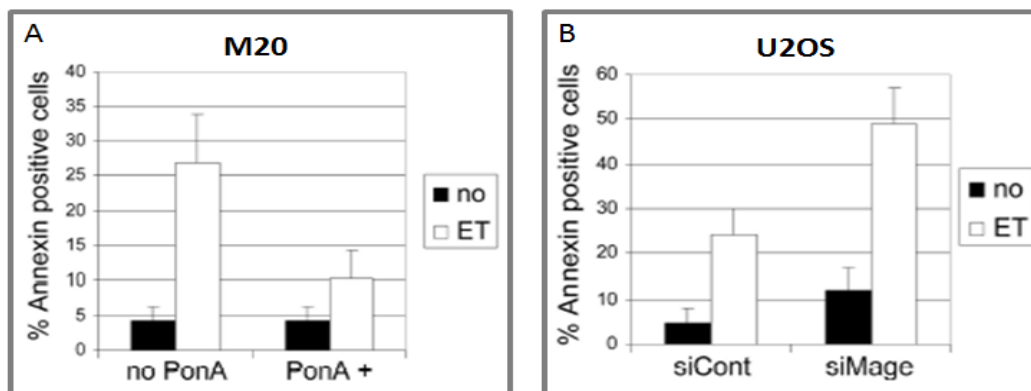
- **MageA11** se comporta como un activador de la transcripción inducida por el receptor de andrógenos (AR) luego del tratamiento con factores de crecimiento epidermal (EGF) (Bai, He et al. 2005, Bai and Wilson 2008). AR es un factor de transcripción dependiente de ligando que modula los efectos de los andrógenos como la testosterona y la dihidroxitestosterona. AR y MageA11 forman un complejo estable en presencia de andrógenos pero esta asociación es transitoria en ausencia del ligando. La interacción entre MageA11 y AR es más estable en presencia de EGF. Esto es interesante debido a que el sitio que es fosforilado y ubiquitinado por EGF está conservado dentro de toda la familia de genes *mage*. Lo que sugiere que este es un mecanismo común dentro de esta familia de proteínas MAGE (Bai and Wilson 2008).

- La regulación de los **MageA3/A6** se encuentra a cargo de FGFR2 (*Fibroblast-Growing Factor Receptor 2*) (Kondo, Zhu et al. 2007, Liu, Cheng et al. 2008, Zhu, Asa et al. 2008). La fibronectina (FN) es una proteína de matriz extracelular que promueve la proliferación, la migración y la invasión que conducen a la metástasis (Ryu, Jimi et al. 1999). Las células tumorales presentan frecuentemente una adhesión disminuída debido a la falta de depósito de FN del estroma, permitiendo una proliferación, migración, invasión y metástasis más rápidas. Se encontró que la desregulación de FN estimula la proliferación celular del cáncer de tiroides y el crecimiento tumoral (Liu, Cheng et al. 2008). Esta desregulación de FN incrementa la expresión del gen de *mageA3*. MageA3 reduce la proporción de células en las fases G0-G1 y aumenta la de células entrando en la fase S del ciclo celular. Consistente con esto, MageA3 disminuye los niveles de p21, promoviendo la fosforilación de la pRb. La expresión de MageA3 promueve significativamente la migración, la invasión celular y el crecimiento tumoral. Así MageA3, como blanco de FN, acelera la progresión del ciclo celular a través de la reducción de p21, un efecto facilitado por la disminución del nivel de p53 y su sobre-expresión promueve un aumento de la proliferación celular y del tamaño de tumores primarios como también el aumento en el número y tamaño de focos metastásicos de pulmón (Liu et al, 2008).

- En el 2007 fue reportado que diversas proteínas **MAGE de tipo I** eran capaces de unir y formar complejos con la proteína KAP1 (Yang, O'Herrin et al. 2007). KAP1, también conocida como TRIM28, es una proteína RING E3-ubiquitina ligasa universalmente

conocida como un co-represor transcripcional, siendo uno de sus blancos el factor p53. KAP1 forma complejos con Mdm2 y de esta manera estabiliza la interacción de Mdm2 con p53, y así su consecuente represión (Wang, Ivanov et al. 2005). Además ejerce su función como E3-ubiquitina ligasa sobre p53, la cual se vio incrementada por las proteínas MAGE-I, más específicamente **MageA2, -A3, -A6 y -C2** (Yang, O'Herrin et al. 2007, Doyle, Gao et al. 2010). De esta manera las proteínas MAGE-I contribuyen al estado tumorigénico mediante la ubiquitinación y degradación de p53. Más aún se observó que la supresión de proteínas MAGE-I, disminuía la formación de complejos KAP1-p53, activando la respuesta transcripcional de p53 (Bhatia, Yang et al. 2011, Feng, Gao et al. 2011).

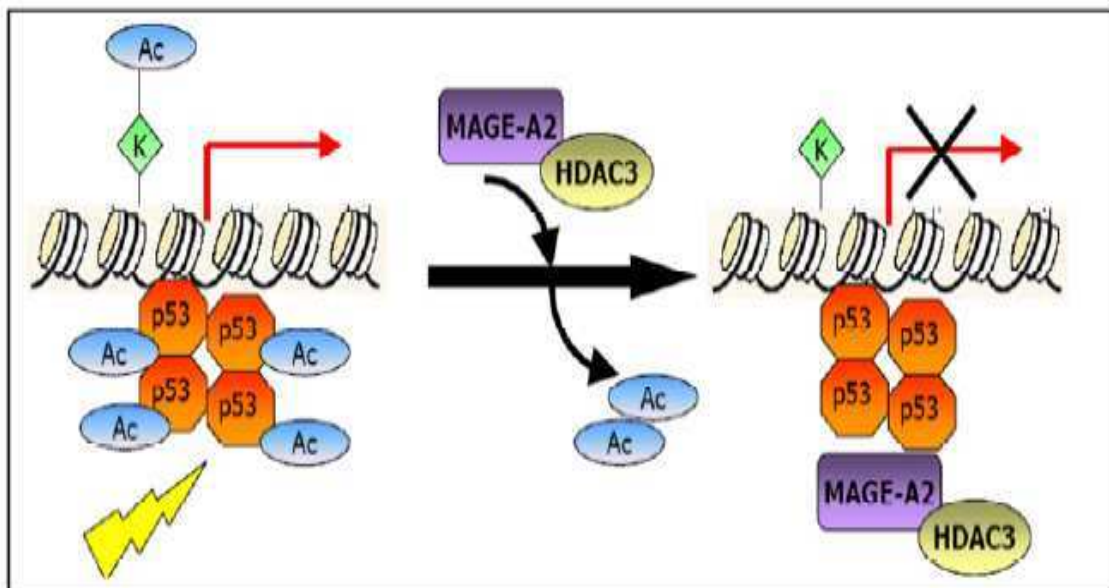
- Nuestro grupo de trabajo ha sido pionero en demostrar el mecanismo por el cual **MageA2** causa la resistencia a ciertos agentes quimioterapéuticos en células de melanoma humano (Figura I.13).



**Figura I.13:** Ensayo de proliferación celular por recuento de células positivas para Anexina con el tratamiento o no de Etoposide (ET o no, respectivamente) en la línea celular: M20 (línea U2OS con HA-MageA2 inducible) en ausencia o presencia de Ponasterona A (PonA no o +, respectivamente) para sobre-expresar a MageA2 (A). U2OS previamente transfectada con siRNA control o contra Mage-A (siCont o siMage, respectivamente) para silenciar a MageA2 (B). Figura tomada de (Monte, Simonatto et al. 2006).

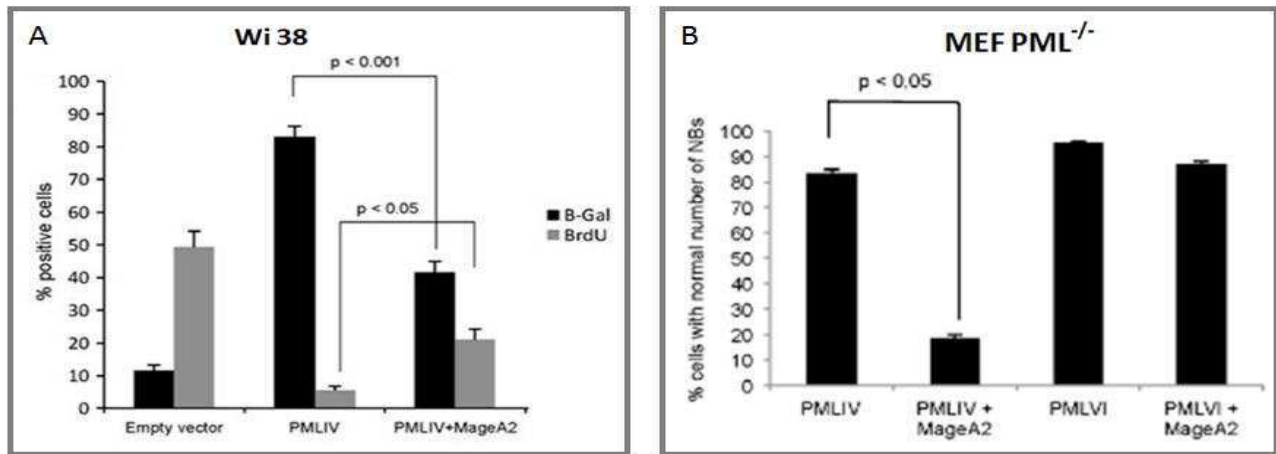
Este mecanismo involucra la inhibición de la actividad transcripcional del oncosupresor p53 mediante la acción de deacetilasas de histonas, HDACs (Figura I.14) (Monte, Simonatto et al. 2006). Además se observó que MageA2 puede reprimir la función tanto de p53 como de p73 pero no de p63 lo que indica especificidad en la regulación de la familia de estos factores (Monte, Simonatto et al. 2006).

Luego de nuestras observaciones sobre la inhibición de p53 por proteínas MAGE-I, otros grupos confirmaron esta relación y aportaron nuevos detalles sobre los mecanismos de regulación (Yang, O'Herrin et al. 2007, Doyle, Gao et al. 2010, Marcar, Maclaine et al. 2010). Siendo una importante observación que la mayoría de las células tumorales co-expresan varios tipos de proteínas Mage-A incrementando su potencialidad para regular específicamente los miembros de la familia p53 involucrados en el control de la proliferación celular (Grigoriadis, Caballero et al. 2009).



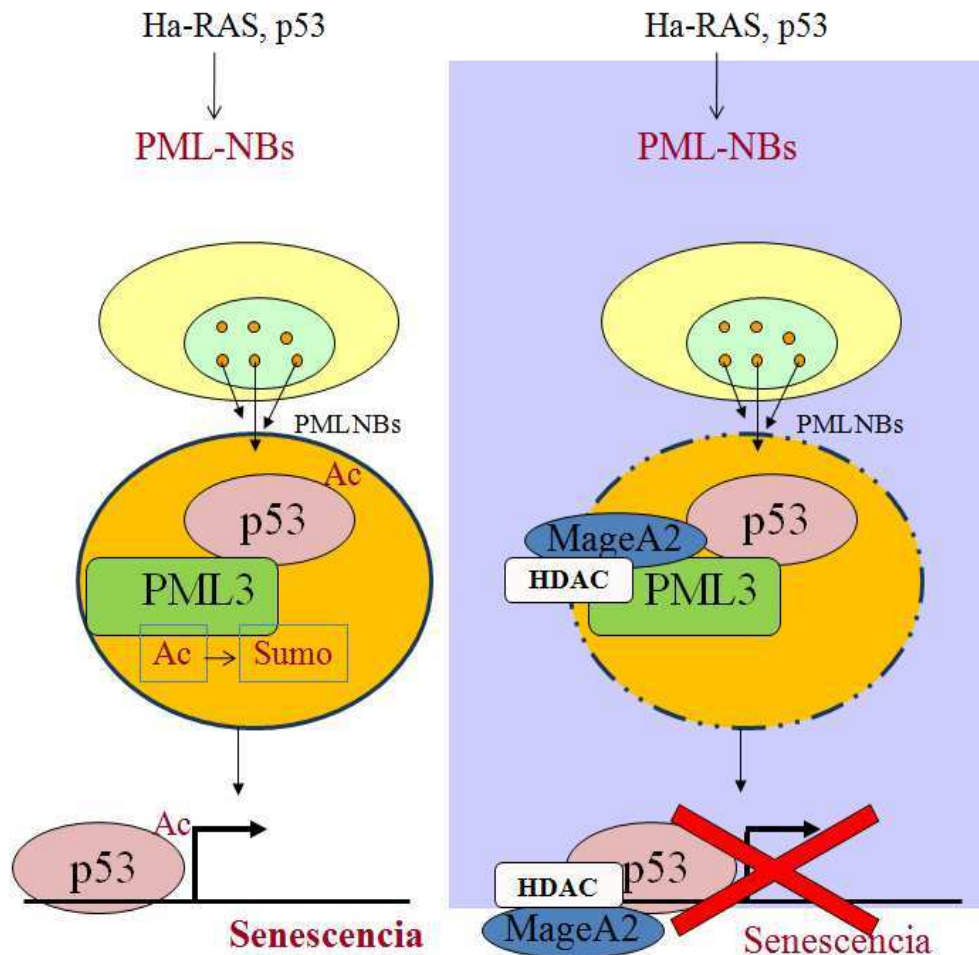
**Figura I.14:** Modelo propuesto para explicar el mecanismo por el cual MageA2 inhibe la actividad transcripcional de p53.

Recientemente hemos reportado otros estudios sobre MageA2 en los cuales se demostró que el complejo MageA2/HDAC3 interactúa también con PML-IV, interfiriendo, en este caso, sobre la senescencia inducida por el eje PML-IV/p53. De esta manera el complejo MageA2/HDAC3 afecta las modificaciones post-traduccionales, desacetilando tanto a p53 como PML-IV de forma independiente. Nosotros observamos que en células que sobre-expresan MageA2, la inducción de la senescencia dependiente de PML/p53 está disminuida (Figura I.15.A) (Peche, Scolz et al. 2012). Esto se debe a que MageA2/HDAC3 se une específicamente a PML-IV, y al desacetilar a PML-IV interfiere en la sumoilización de la proteína, logrando, finalmente, desestabilizar la formación de los PML-NBs (Figura I.15.B); y en consecuencia la activación de p53 se ve disminuida.



**Figura I.15:** Recuento de células:  $\beta$ -gal/BrdU positivas induciendo senescencia mediante la transfección de PML-IV sólo o con el agregado de MageA2, en células normales Wi38 (A). Porcentaje de células MEF PML<sup>-/-</sup> en las cuales co-localiza PML con SUMO1 en células transfectadas con PML-IV o PML-VI sólo o en combinación con MageA2. Figura tomada de (Peche, Scolz et al. 2012).

Paralelamente se demostró que la sobre-expresión de Ha-ras en células que expresan MageA2 no desencadena la respuesta senescente inducida por PML-IV(Figura I.16). Sin embargo, otras proteínas Mage-A evidencian actividad limitada o ausente sobre p53 y/o PML-IV, como por ejemplo MageA4 (Peche, Scolz et al. 2012).



**Figura I.15:** Modelo propuesto para explicar el mecanismo por el cual MageA2 inhibe la actividad transcripcional de p53 promoviendo la senescencia celular mediada por PML-IV ante la inducción por el oncogen Ha-ras.

- En nuestro laboratorio se estudia también la regulación de Receptores de Esteroides por parte de **MageA6** y **MageA11**. Por un lado se ha reportado la capacidad de **MageA6** para unir HDACs y formar complejos con el receptor de glucocorticoides (GR) inhibiendo de esta manera su actividad transcripcional (manuscrito en preparación, Laiseca 2015).

Además, se comenzó con el estudio de la cooperación entre distintos miembros del subgrupo Mage-A. Se reportó que **MageA6** es capaz de colaborar con MageA11 en el aumento de la actividad transcripcional del AR, cuya estimulación por hormonas confiere ventajas en el crecimiento celular en cáncer de próstata. El mecanismo por el cual

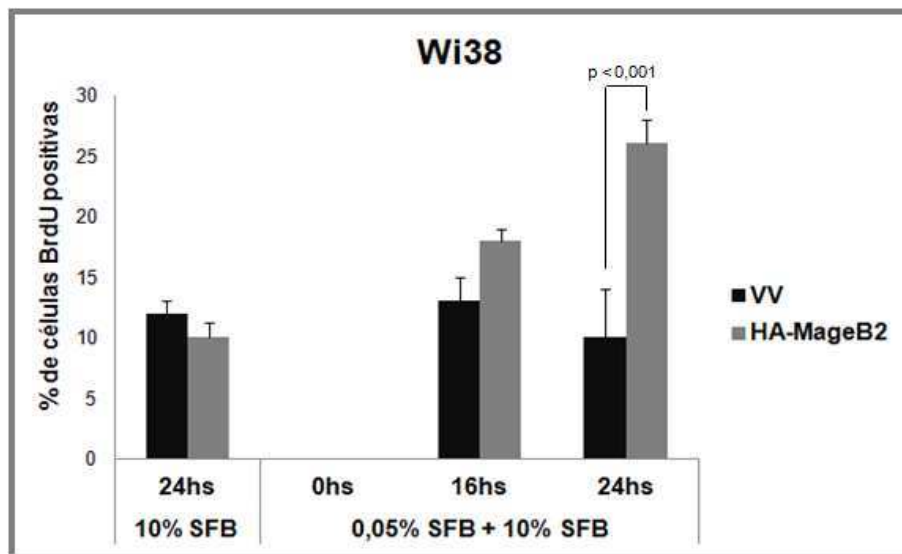
MageA6 confiere aumento de la actividad transcripcional de AR es generar una mayor estabilización de MageA11, proceso que fue específico para MageA6, ya que no se observó con otros miembros del subgrupo Mage-A. Además fue demostrado que la estabilidad incrementada de MageA11 se debía a la unión amoniacídica de MageA6 con MageA11, a través de sus dominio MHD, y que, a su vez, esa unión reducía la ubiquitinación y posterior degradación de MageA11. Demostramos por primera vez que MageA11 y MageA6 son colaboradores en la actividad transcripcional de AR y en consecuencia en la progresión tumoral (manuscrito en preparación, Laiseca 2015). Dando lugar a un nuevo tipo de mecanismo de cooperación entre dos proteínas Mage-A que tendría una acción sinérgica a través de mecanismos destinados a dar ventajas en procesos asociados con el desarrollo tumoral.

### 2.1.2 Función de proteínas del Grupo Mage-B

La información sobre las proteínas del subgrupo Mage-B, es mayormente descriptiva, y se limita casi únicamente a datos sobre la secuencia, la localización en el cromosoma X y su expresión en distintos tumores. Aún no se encuentran reportes sobre sus posibles funciones; pero se sabe que éstos son muy similares entre sí. El porcentaje de identidad entre la región codificante de los genes *mageB1*, *mageB2*, y *mageB4* es del 80%; mientras que *mageB3* es el menos relacionado mostrando un 70% de identidad. Entre la región codificante de los genes *mage-B* y el gen *mageA1* la identidad es de un 60% (Lurquin, De Smet et al. 1997). Sumado a estos datos se reportó que la delección de genes *mage-b* murinos es suficiente para suprimir el crecimiento de melanomas en modelos de ratones (Yang, O'Herrin et al. 2007).

La función biológica de estas proteínas no ha sido todavía estudiada por lo que estamos centrando nuestro estudio en ellas. Nuestros datos preliminares de este trabajo, presentan la primera caracterización funcional de la proteína MageB2, la cual tiene la particularidad de localizar en los nucléolos y tener una actividad pro-proliferativa. Uno de los primeros experimentos realizados previamente fue un ensayo de proliferación celular por incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU) en la línea celular normal humana de fibroblastos de pulmón, Wi38. Las células Wi38 plaqueadas, fueron transfectadas con un

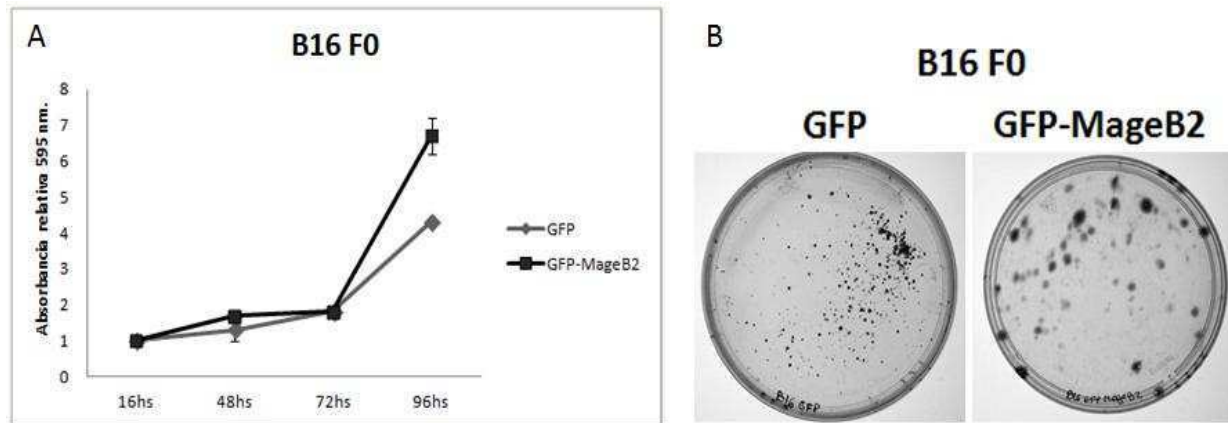
vector vacío (VV) o un vector que expresa a la proteína MageB2 etiquetada con el péptido HA (HA-MageB2). Luego de 24 horas se les privó de suero fetal bovino (SFB), llevándolas de un 10% a un 0,05% de SFB durante 24 horas, logrando de esta manera un efecto de arresto celular. Por último, en algunos pocillos se reincorporó 10% SFB y se cultivaron por 16 o 24 horas respectivamente. Transcurrido los tiempos de reincubación con el SFB se cuantificaron las células BrdU positivas. En la figura I.16 se muestra el recuento del porcentaje celular con BrdU incorporado. Se observa que la tasa de incorporación es mayor en presencia de MageB2. La expresión de MageB2 aumenta la proporción de células normales en división.



**Figura I.16:** Ensayo de proliferación celular por incorporación de BrdU en líneas normales de fibroblastos humanos de pulmón Wi38 bajo condiciones de arresto celular por privación de suero. Las células fueron transfectadas transientemente con el vector que expresa HA-MageB2 o el vector vacío como su control (VV). Las barras de error indican el D.E.; se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa.

Luego para corroborar el rol potencial de MageB2 humano en la estimulación del crecimiento tumoral, se generaron líneas estables de células de melanoma de ratón B16-F0, transduciendo con vectores retrovirales (pLPC) que expresa la proteínas MageB2 fusionada a la proteína *Green Fluorescent Protein* (GFP-MageB2) o GFP como control (B16-GFP-

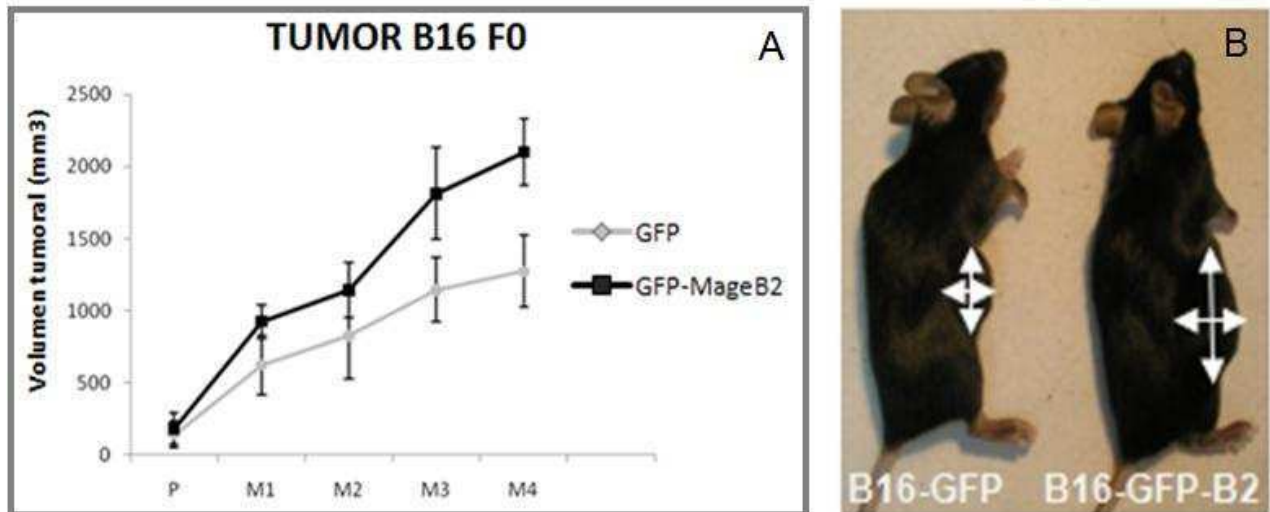
B2 y B16-GFP respectivamente). Primero se realizaron los ensayos de cinética de crecimiento por el método de cristal violeta, y el ensayo de formación de colonias (Figura I.17). Los resultados indican que MageB2 humano genera un incremento de la proliferación celular en esta línea murina similar al observado en las líneas celulares humanas.



**Figura I.17:** Cinética de crecimiento de las líneas celulares B16 F0/GFP y B16 F0/ GFP-MageB2. Medición de la Absorbancia a 595 nm. de la tinción con Cristal Violeta (A). Fotografía de la formación de colonias (B). Las barras de error indican el D.E.

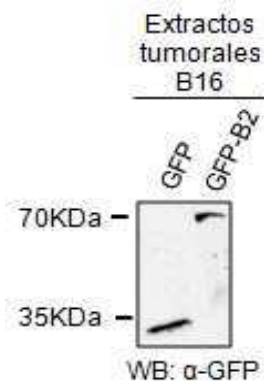
En segundo lugar con estas líneas murinas estables para la expresión de GFP o GFP-MageB2 se realizaron inoculaciones subcutáneas en ratones C57Black. Se utilizaron cinco ratones por cada grupo de estudio. El crecimiento del tumor fue examinado regularmente hasta obtener un tamaño de masa palpable ( P), a partir del cuál se siguió cada ratón independientemente tomando cuatro mediciones ( M) por cada uno. Los tumores generados por la línea B16 F0/GFP-MageB2 fueron palpables previamente a los del grupo control y, como era de esperarse, generaron tumores significativamente de mayor volumen que los observados por los tumores de la línea B16 F0/GFP (Figura I.18).





**Figura I.18:** Determinación *in vivo* del crecimiento tumoral en ratones C57Black inoculados con las líneas B16F0/ GFP o GFP-MageB2. Promedio de la medición (M) del volumen de los tumores en 5 ratones independientes de cada grupo desde que fueron palpables (P) (A). Imagen representativa de los ratones de cada grupo al tiempo M4, las flechas indican las medidas tomadas para determinar el volumen del tumor (B). Las barras de error indican el D.E.

Para confirmar la expresión de GFP o GFP-MageB2 en estos tumores, se realizaron extractos proteicos al azar de los tumores de cada grupo. Se realizó una corrida electroforética y posterior Western Blot para revelar utilizando un anticuerpo anti-GFP (Figura I.19). Efectivamente se observa la presencia de la proteína GFP o GFP-MageB2 según corresponda.



**Figura I.19:** Western Blot de los extractos proteicos de tumores obtenidos de los ratones C57Black inoculados con células estables B16F0/ GFP o GFP-MageB2. Se revela con un anticuerpo α-GFP.

Este ensayo demuestra que la actividad del MageB2 humano promueve el crecimiento celular tanto *in vitro* como *in vivo*. Y estos datos nos llevaron al estudio del mecanismo por el cual MageB2 podría inducir proliferación celular, el cual es presentado en este trabajo de tesis.

### 2.1.3 Función de proteínas del Grupo Mage-C

Desde el punto de vista inmunológico, la familia de antígenos producida por los genes *mage-C* es reconocida por una proteína de los CTLs que es distinta a la que reconoce los antígenos de Mage-A. La proteína que reconoce el antígeno de los Mage-C es la HLA-B\*4403 (Laduron, Deplus et al. 2004, Ma, Germeau et al. 2004).

- **MageC2** fue encontrada en varios tipos de tumores malignos, tanto en líneas celulares de melanoma, como en cáncer de testículo; y se observó que se localiza en el núcleo de células neoplásicas. Poco es lo que se sabe acerca de la función biológica de los antígenos producidos por MageC2 aunque algunos ensayos indican que podrían actuar como co-represores o co-activadores de la expresión génica por interacción con proteínas de unión a ADN (Zhuang, Zhu et al. 2006). Como por ejemplo, mediante la unión entre MageC2-TRIM28 cuyo blanco es el oncosupresor p53, consistentemente con su acción tumorigénica (Doyle, Gao et al. 2010).

- **MageC1** suele expresarse frecuentemente en lesiones osteolíticas. La expresión de MageC1 es más frecuente en pacientes con un estado avanzado de la enfermedad. Los pacientes que expresan este antígeno en células de mieloma muestran un elevado nivel de proliferación celular (Atanackovic, Hildebrandt et al. 2010, Pabst, Zustin et al. 2010).

## 2.2 Subfamilia MAGE-II

Entre las proteínas de la familia MAGE-II más estudiadas se encuentran *necdina*, NRAGE y MageD4.

### 2.2.1 Necdina

El gen murino *necdina* es altamente expresado en neuronas postmitóticas en el cerebro y en el hipotálamo (Uetsuki, Takagi et al. 1996, Niinobe, Koyama et al. 2000). La deficiencia de Necdina en ratones muestra una muerte post-natal por deficiencia respiratoria (Gerard, Hernandez et al. 1999). Necdina parece ser un supresor del crecimiento de neuronas post-mitóticas, funcionalmente similar a pRb. Necdina interactúa con E2F1 y el factor transcripcional p53 reprimiendo la actividad transcripcional de ambos factores (Taniura, Taniguchi et al. 1998, Taniura, Matsumoto et al. 1999). Lo cual sugiere que la *necdina* induce el arresto del ciclo celular y controla la apoptosis neuronal a través de las interacciones con E2F1 y p75NTR (Salehi, Roux et al. 2000, Kuwako, Taniura et al. 2004). Sin embargo, recientemente se reportó que su expresión forzada en células tumorales puede inducir la proliferación e inhibir la apoptosis mediada por p53 (Hasegawa and Yoshikawa 2008), mientras que era conocido que la ausencia del gen *necdina* causa el síndrome conocido con el nombre de Prader-Willi, un desorden neurogenético que altera el desarrollo y funcionamiento del hipotálamo provocando retraso en el desarrollo global, hipoventilación, obesidad e hipogonadismo, entre otros síntomas (Nakada, Taniura et al. 1998, Taniura, Matsumoto et al. 1999).

### 2.2.2 Grupo Mage-D

- **MageD4** es un regulador negativo de la proliferación durante la gametogénesis (Barker and Salehi 2002, Sang, Lian et al. 2011, Ladelfa, Peche et al. 2012).

- La proteína más estudiada de este subgrupo es **MageD1 o NRAGE**, la cual es capaz de interactuar con múltiples proteínas adaptadoras y, por ello, se ve involucrada en varias funciones celulares tales como la regulación de la apoptosis, de la transcripción, del ciclo

celular, de la adhesión celular y de la angiogénesis. Se ha demostrado que MageD1 es una proteína de unión a BRCA2 y, mediante esa unión, permite la estabilización de BRCA2 y suprime la proliferación celular (Tian, Rai et al. 2005). La transfección de MageD1 puede revertir parcialmente el fenotipo maligno de células de carcinoma de mama, debido a que actúa sinérgicamente con BRCA2 en la supresión de la proliferación de las células epiteliales mamarias (Du, Zhang et al. 2009).

Se sabe también que MageD1 se une al receptor de neurotrofinas p75 (Salehi, Roux et al. 2000, Bronfman, Tcherpakov et al. 2003) y a proteínas pertenecientes a los inhibidores de la apoptosis (IAPs) (Di Certo, Corbi et al. 2007), y de esta manera MageD1 media el arresto celular en G1 y facilita la inducción de la apoptosis dependiente de NGF (nerve growth factor) (Salehi, Roux et al. 2000, Kuwako, Taniura et al. 2004, Wen, Xue et al. 2004, Bertrand, Kenchappa et al. 2008). Además, MageD1 arresta el crecimiento celular dependiente de la vía de p53, debido a que su sobre-expresión incrementa la expresión de p53 y su fosforilación en Ser392, dando como resultado la activación transcripcional de p53 y el consecuente aumento de p21. Confirmando estos datos se demostró que MageD1 no podía afectar la proliferación celular en MEF p53<sup>-/-</sup>, sugiriendo que es necesaria la presencia del factor p53 para ejercer su función biológica (Wen, Xue et al. 2004, Du, Zhang et al. 2009).

### 3. Regulación transcripcional de los genes *mage*

Otra característica típica de los genes *mage-I* es que estos contienen promotores ricos en islas CpG por lo que pueden ser inhibidos por metilación del ADN (Milutinovic, D'Alessio et al. 2007). En concordancia con los eventos tempranos epigenéticos como la desmetilación del ADN; se observó que la expresión de los genes *mage-I* se activa principalmente luego de este tipo de eventos epigenéticos frecuentes en las células tumorales (De Smet, Lurquin et al. 1999, De Smet, Lorient et al. 2004, Vatolin, Abdullaev et al. 2005). Es conocido que la metilación de las islas CpG de los promotores es la principal causa del silenciamiento de la mayoría de los MAGE-I en los tejidos sanos (De Smet, De Backer et al. 1996, De Smet, Lorient et al. 2004, James, Link et al. 2006). La expresión de

distintos genes *mage-I* aumenta fuertemente en células tratadas con drogas que revierten la metilación del ADN (como la 5-aza-desoxicitidina), y también en células *knockout* para DNMT1/3b, una ADN metiltransferasa o en células *knockout* para G9a o GLP/Eu-HMTase1, una histona metiltransferasa (Tachibana, Ueda et al. 2005, James, Link et al. 2006, Link, Gangisetty et al. 2009). Se observó, además, que la desmetilación masiva de la cromatina, induce tanto la expresión de genes *mage*, como la formación de tumores en ratones (Eden, Gaudet et al. 2003, Gaudet, Hodgson et al. 2003, Ladelfa, Peche et al. 2012).

Recientemente se ha demostrado que un miembro de los Cancer-Testis antígenos, el parálogo del factor CTCF llamado BORIS (Brother Of the Regulator of Imprinted Sites), es un eficaz inductor de los genes *mage-I* (Bhan, Negi et al. 2011), ya que su unión a la cromatina causa hipometilación y la activación de la transcripción en las regiones del cromosoma X donde se localizan estos genes (Vatolin, Abdullaev et al. 2005). Importante es notar que mientras CTCF induce arresto y represión transcripcional, la expresión de BORIS está vinculada a la proliferación y potencial transformación (Klenova, Morse et al. 2002). Este hecho sugiere los eventos que siguen a la sobre-expresión de BORIS en las células tumorales (como CTAs) y la regulación de la transcripción mediada por modificaciones epigenéticas, podrían ser la causa de su potencial transformante: entre ellos, la inducción de los MAGE-I.

En conjunto, estos datos indican que la activación de los genes *mage-I* es un evento temprano en el cáncer (Jang, Soria et al. 2001) y que su expresión correlaciona con mal pronóstico, ya que confieren ventajas proliferativas y de resistencia a la apoptosis (Sang, Lian et al. 2011, Sang, Wang et al. 2011).

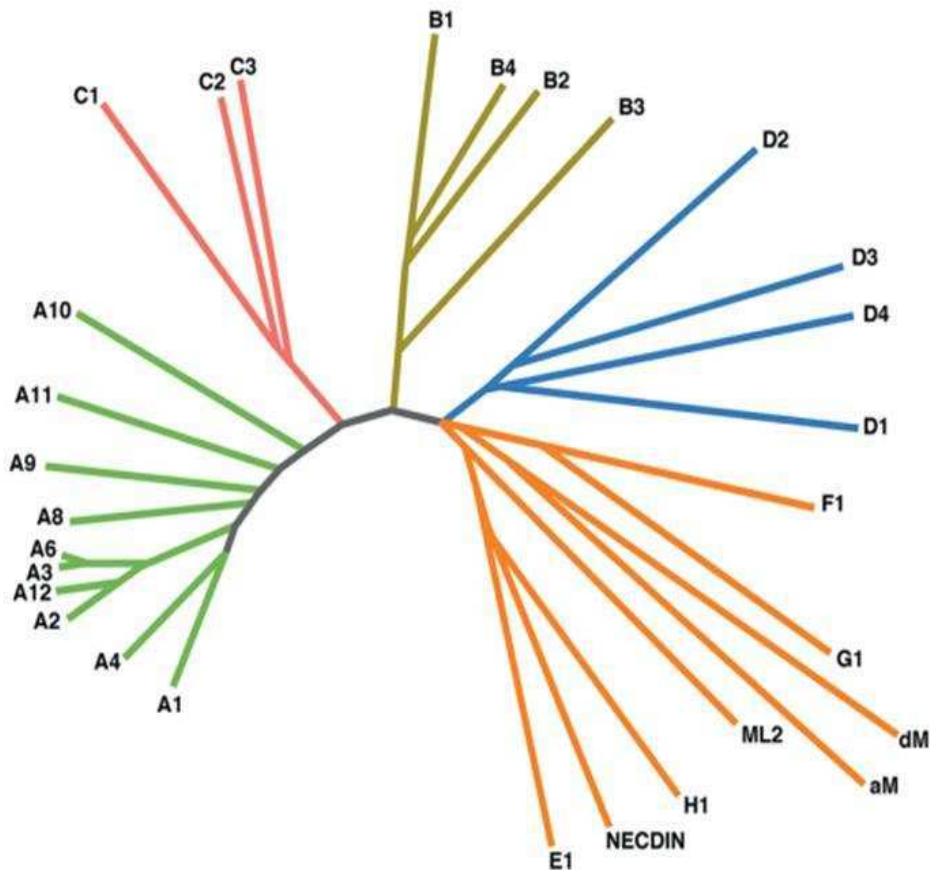
## 4. Estructura génica

Estudios filogenéticos basados en el análisis de las secuencias de los MAGE indican que la evolución de esta familia multigénica, habría surgido a partir de uno o varios genes antecesores de Mage-D, y que por retrotranscripción, duplicación génica y posterior trasposición generaron los grupos multigénicos conocidos en la actualidad, manteniendo una alta homología de secuencia entre ellos (Figura I.20) (Chomez, De Backer et al. 2001, Scanlan, Gordon et al. 2002, Scanlan, Gure et al. 2002, Artamonova and Gelfand 2004).

Esta información está basada en la similitud entre el ARN mensajero (ARNm) de Mage-D y las secuencias genómicas de los genes *mage-A*, *-B* y *-C*. Además los genes de la familia MAGE no contienen intrones en la región donde se codifica la proteína, mientras que los genes *mage-D* contienen numerosos intrones (Artamonova and Gelfand 2004).

Los autores proponen que Mage-C fue generado por una duplicación génica de genes *mage-A*. Esta conclusión fue obtenida a partir de la similitud de su secuencia codificante. Afirman también que el resto de las subfamilias fueron generadas por retrotransposición. Se ha observado que los genes *mage-A* y *mage-C* tienen secuencias de unión a factores de transcripción conservadas. Lo cual hace pensar que ambos genes podrían tener una regulación génica similar (Katsura and Satta 2011). En efecto, a menudo se encuentran bajo una misma regulación transcripcional resultando en su co-expresión (Jungbluth, Busam et al. 2000).

Algunos genes, como por ejemplo *mageA11* están menos conservados sugiriendo una evolución más reciente. De hecho MageA11 se expandió únicamente en primates, mientras que otras proteínas MAGE, como las del grupo Mage-B, tienen homólogos humanos en ratón (Wilson 2010).



**Figura I.20:** Árbol filogenético de los distintos MAGE. Extraído de (Barker and Salehi 2002).

Por todo ello, las proteínas producto de los genes *mage*, a pesar de poseer una alta homología de secuencia, no necesariamente parecerían ser funcionalmente redundantes; lo que significa que a pesar de poseer secuencias homólogas (algunos con mayor identidad que otros) no implicaría que su función se conserve (Ladelfa, Peche et al. 2012); sino que al contrario, la co-expresión de más de una ellas favorecería a la progresión del ciclo celular mediante la posible cooperación que se obtendría a través de diferentes vías referentes a la regulación del ciclo celular.

# Aplicaciones de la Biología Molecular al diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer

---

En los apartados anteriores hemos descrito algunos de los extraordinarios avances recientes en nuestra comprensión de los mecanismos moleculares que rigen los procesos tumorales. Entre esos se destacan los mecanismos que controlan y regulan la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de células, tanto normales como tumorales. Sin embargo, al día de hoy, hay que reconocer que esos avances han reportado todavía pocos beneficios directos al paciente de cáncer. Para una gran mayoría de tumores, el éxito terapéutico depende fundamentalmente de una detección precoz que permita aplicar, a un tumor bien localizado, aproximaciones terapéuticas curativas como la cirugía o la radioterapia. Desafortunadamente, un gran número de cánceres han metastatizado ya en el momento del diagnóstico, por lo que ya no podrían ser curados solamente mediante cirugía o radioterapia. Es indudable que la quimioterapia ha progresado también notablemente en años recientes, y que se han encontrado combinaciones de drogas antitumorales efectivas ante distintos tipos de tumores. Sin embargo, un buen porcentaje de formas tumorales se muestran bastante refractarias a los protocolos quimioterapéuticos disponibles actualmente. Es por ello, que la tasa de mortalidad por cáncer no ha disminuido significativamente en los últimos años y esta enfermedad sigue hoy por hoy afectando a uno de cada cuatro adultos en el mundo occidental y a nivel mundial en 2014 se le atribuyeron 12 millones de muertes (Estadística tomada de la Organización Mundial de la Salud).

En ese contexto, el gran desafío del momento actual, en esta nueva era de la tecnología que nos permite avanzar a pasos agigantados en la investigación del cáncer, es el de trasladar a la práctica clínica los muy importantes avances de nuestro entendimiento del cáncer a nivel molecular y de investigación básica. La tarea no es fácil. Por una parte sabemos que las alteraciones moleculares y celulares que hemos caracterizado en tumores



pueden afectar a prácticamente cualquiera de los linajes celulares de nuestro organismo, produciendo mutaciones que normalmente no pueden ser evitadas. Por otra parte, las dianas de las mutaciones malignas son genes esenciales para el crecimiento y desarrollo normal de cualquier célula del organismo. Estas dificultades suponen obstáculos teóricos y prácticos a la hora de diseñar aplicaciones prácticas de todos esos conocimientos con el objetivo de eliminar el cáncer de nuestra sociedad humana (Chin and Gray 2008).

Basados en estos conocimientos podemos prever, al menos, cuatro niveles de distintas aproximaciones para nuevas aplicaciones concretas en el control de las enfermedades tumorales (Garraway and Lander 2013):

- Identificación de individuos con predisposición genética. Debido a la carga genética recibida de sus padres, algunos individuos en la población humana tienen un riesgo especialmente elevado de sufrir enfermedades tumorales. Los conocimientos actuales ofrecen, en muchos casos, la posibilidad de reducir significativamente la probabilidad de sufrir esas enfermedades. Mediante procedimientos de *screening* que permitan detectar las alteraciones moleculares que correspondan a los estadios iniciales de desarrollo de dichas enfermedades. En este contexto, se puede analizar la expresión de los MAGE-I, como factor pronóstico asociado al desarrollo de cáncer.
- Reducción de la exposición a agentes ambientales productores de mutaciones oncogénicas. Conocemos la naturaleza de las mutaciones capaces de activar oncogenes y genes supresores tumorales. También conocemos, al menos en parte, los mecanismos de producción de dichas mutaciones por diversos agentes ambientales. En el futuro cabe esperar una reducción significativa de las mutaciones tumorales mediante la implantación de programas que minimicen la exposición de la población humana a los agentes carcinogénicos de tipo físico, químico o biológico que han sido identificados en los últimos veinte años.
- Diagnóstico temprano y preciso de los cambios premalignos y malignos en los pacientes. La detección de las alteraciones moleculares responsables de procesos tumorales que, en algunos casos, ya es técnicamente posible muchos años antes de que

se observen manifestaciones clínicas de los mismos, debe producir beneficios en la reducción de las tasas de muerte por cáncer en las próximas décadas.

- Tratamientos efectivos, que destruyan específicamente las células tumorales sin afectar las células normales del organismo. Los conocimientos moleculares acumulados están permitiendo, por primera vez en la historia, abandonar los procedimientos de “ensayo y error” como método de selección de nuevos tratamientos antitumorales. Por el contrario, estamos en condiciones de utilizar esos nuevos avances para proceder al diseño racional de nuevas aproximaciones terapéuticas que superen la falta de especificidad y los efectos secundarios típicos de los tratamientos actuales. Siendo la detección de proteínas MAGE-I un aporte de gran utilidad para detectar células tumorales de las células normales.

En conjunto con todos los datos proporcionados en esta introducción, creemos que la posibilidad de inhibir la función de la mayoría de estas proteínas MAGE-I por un mecanismo común, representa un nuevo desafío con gran potencial en el campo de la biología tumoral, para contribuir a plantear estrategias que ayuden, en un futuro, a diseñar nuevas terapias anti-cancerígenas.

# Hipótesis y Objetivos

# Hipótesis

---

En la Introducción nos propusimos destacar la **relevancia** que tienen las proteínas MAGE de tipo I en las células tumorales. Principalmente implica que la expresión de los genes *mage-A* y *mage-B* abre un gran potencial tanto para el conocimiento básico de las células tumorales, como para la estrategia de nuevas terapias o su potencial uso como factor pronóstico o diagnóstico del cáncer. Sin embargo, mientras no se conozcan sus funciones biológicas específicas y *a priori* se los considere con actividades superpuestas y redundantes, su potencial en oncología no podrá ser aprovechado.

El desarrollo de la investigación en los últimos años ha indicado que: diferentes proteínas MAGE-I pueden regular diferentes vías de señalización y que alguna de estas vías están estrechamente vinculadas con el cáncer. En conjunto nuestra **hipótesis general** del presente trabajo de tesis es que la expresión conjunta de diferentes proteínas MAGE-I podría complementarse en la regulación de diferentes vías centrales y, de esta manera, generar potencial oncogénico para colaborar en la proliferación y la predisposición a la transformación tumoral.

Las **hipótesis específicas** de este trabajo fueron que:

- la actividad proliferativa de MageB2 podría involucrar vías diferentes a la de p53, a pesar de la alta homología de secuencias entre los MAGE de tipo I.
- parte del repertorio supresor tumoral de las células podría bloquear la actividad de MageA2 sobre p53 y llevar a la restitución de la actividad del factor oncosupresor p53.

# Objetivos

---

El **objetivo general** en que se enmarca este trabajo de tesis es caracterizar y comparar a dos miembros de la familia de proteínas MAGE-I:

- La proteína **MageB2**: de la que aún no se encuentran reportes sobre sus funciones biológicas.
- La proteína **MageA2**: una de las más estudiadas cuya función está descrita anteriormente por nuestro grupo como un inhibidor del supresor tumoral p53, mediante el reclutamiento de HDAC3.

En base a la hipótesis planteada y al objetivo general, este trabajo de tesis se puede dividir en dos partes, cuyos **objetivos específicos** son los siguientes:

## Parte 1

Caracterización funcional de la proteína MageB2:

- A. Estudiar los posibles mecanismos celulares de acción que ejerce MageB2: se analizarán las vías de p53 o pRb/E2F.
- B. Identificar factores transcripcionales inductores y/o represores de su promotor.

## Parte 2

Identificar proteínas con actividad inhibitoria sobre MageA2 que reactiven al factor p53:

- A. Estudiar proteínas previamente identificadas como inductores de p53. En este contexto comenzamos a estudiar: p300, MageD1, p14ARF, RP L11.
- B. Caracterizar si el mecanismo involucra la inhibición de la actividad de MageA2.

# Materiales y Métodos

## **I. Criopreservación**

### **I.a. Congelamiento**

Para preservar las células por un período prolongado se requieren temperaturas extremadamente bajas. Estas temperaturas hacen que el metabolismo celular disminuya significativamente. El principal problema que presenta el congelamiento celular es la formación de cristales en el citoplasma que tienden a romper la membrana celular. Para evitar este inconveniente, se han utilizado diferentes agentes químicos (glicerol, dimetil sulfóxido (DMSO), polivinilpirrolidona) que hacen que la temperatura intracelular descienda de manera gradual.

La suspensión celular a ser congelada ( $10^6$ - $10^7$  cél/ml) se centrifuga a 1000 g durante 5 min., y se agrega al pellet obtenido 1 ml de la mezcla congelante (medio de cultivo:SFB:DMSO; 45:10:10; v/v/v). La suspensión celular se homogeneiza rápidamente y se trasvasa a un criotubo que se envuelve en papel (para evitar el congelamiento inmediato y lograr un enfriamiento gradual), y se lleva las células rápidamente a un freezer de  $-80$  °C. De esta manera se permite que la temperatura disminuya aproximadamente  $1$ - $2$ °C por minuto. Cuando el sistema alcanza dicha temperatura, los criotubos son almacenados en un tanque con nitrógeno líquido a  $-174$ °C.

### **I.b. Descongelamiento**

Para descongelar las células tomamos un criotubo del termo de  $N_2$  líquido y lo calentamos rápidamente a  $37$ °C hasta lograr el descongelamiento de la suspensión celular. Para remover el DMSO, que resulta tóxico para las células, pasamos rápidamente el contenido del criotubo a un tubo cónico de 15 ml con 4 ml de medio de cultivo y lo centrifugamos a 1000 g por 5 minutos. Luego, se remueve el sobrenadante y se resuspende el pellet de células en el volumen adecuado de medio de cultivo fresco y se las plaquea en la superficie deseada.

## **II. Esterilización de materiales y soluciones**

El material fue esterilizado por calor seco ( $160$ - $170$ °C, 90 min), por calor húmedo ( $121$ °C, 1 atm, 30 min) o por radiación gamma, según las características del mismo.

Las soluciones termolábiles fueron esterilizadas por pasaje a través de membrana de ésteres de nitrato y acetato de celulosa, con poros de  $0,22$   $\mu$ m (Millipore), utilizando bomba de vacío en flujo laminar.

### **III. Calidad del agua y reactivos**

Las soluciones, reactivos y medios de cultivo fueron preparados con agua deionizada de calidad ultrapura, con resistividad específica de 18 M $\Omega$  (Simplicity 185, Millipore).

Todas las sales, ácidos y solventes utilizados fueron de calidad analítica.

### **IV. Cultivo celular**

#### **IV.a. Propagación y mantenimiento de las líneas celulares**

Para la propagación y el mantenimiento del stock celular mantuvimos las células en botellas T75 y en un medio compuesto por *Dulbecco's minimal essential medium (high-glucose DMEM)* (Invitrogen) suplementado con 7,5 % NaHCO<sub>3</sub>, 10% de suero fetal bovino al (SFB de marca) y antibióticos 100U/ml penicillina and 100 mg/mL streptomycin (S/P de GIBCO). Contamos con las líneas de celulares: HEK293T (*human embryonic kidney 293 cells* transformadas por la expresión del antígeno T del virus SV40, que inactiva a pRb), U2OS (*Human Osteosarcoma cells*) y HCT116 (*Human Colorectal Carcinoma cells*), obtenidas de ATCC y mantenidas como se indica a continuación. Las HCT116 p53<sup>-/-</sup> fueron provistas por Bert Vogelstein. Las MEF DKO (*Mouse Embryonic Fibroblasts Doble Knockout p53<sup>-/-</sup> mdm2<sup>-/-</sup>*) también fueron cultivadas como se indica a continuación. Las U24 son células U2OS con HA-MageB2 inducible usando el sistema de expresión Ecdysone-Inducible (Invitrogen), por lo que fueron mantenidas con la adición de 1 mg/ml G418 and 250  $\mu$ g/ml Zeocin (Invitrogen) en el medio. Éstas células U24 son inducibles por el agregado de 5  $\mu$ M Ponasterona A (Invitrogen) durante 24 horas.

Los cultivos fueron mantenidos a una densidad de 1,5 x 10<sup>5</sup> células/ml en estufa a 37°C (Revco) en atmósfera saturada con vapor de agua y 5% de CO<sub>2</sub>. El medio fue renovado cada 2-3 días. Para ello, las células fueron sedimentadas por centrifugación a 1000 g durante 5 min a 25°C y resuspendidas en medio de cultivo. Realizamos el pasaje de las células entre 48 y 72 horas luego del plaqueo. Para esto, aspiramos el medio de cultivo y lavamos con *buffer* fosfato salino pH 7,4 (PBS: NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM). Luego, descartamos el PBS y tratamos con 1 ml de tripsina (Gibco) a 37°C de 3 a 5 minutos, agitando ocasionalmente las placas para favorecer la disgregación de las células. Transcurrido ese tiempo, completamos la disgregación de forma mecánica con pipeta para evitar que queden agregados de células. Monitoreamos el proceso mediante observación al microscopio. Para inactivar la tripsina agregamos igual volumen de medio de cultivo. Luego, colocamos el volumen de suspensión con la cantidad de



células adecuadas en una nueva placa de cultivo y agregamos medio nuevo de forma tal que la tripsina quede diluida al menos 10 veces. La inactivación de la tripsina se debe a la presencia de suero en el medio de cultivo. Por un lado, el suero contiene inhibidores de la enzima a la vez que el alto contenido proteico del mismo compite con las proteínas presentes en el cultivo por el uso de la enzima.

#### **IV.b. Viabilidad y recuento celular**

La viabilidad celular fue determinada mediante la prueba de exclusión de colorante supravital, en una dilución de la suspensión celular 1:2 con azul Tripán 2 g/l en PBS. El recuento de células en esta suspensión fue realizado en microscopio óptico con aumento de 40×, utilizando una cámara de Neubauer modificada (McAteer & Davis, 1994).

Determinamos la cantidad de células mediante el método de exclusión con Azul de Tripán. Para eso, tomamos 10 µl de suspensión de células y los mezclamos con un volumen igual de solución 4% de Azul de Tripán (4% Azul de Tripán, 8% NaCl, 0,6% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5% Metil-p-hidroxibenzoato). Para el recuento, tomamos 10 µl de dicha dilución, los colocamos en una cámara de Neubauer y contamos las células no coloreadas en los cuatro campos de la cámara. En caso de tener un número muy elevado de células para realizar el recuento, realizamos diluciones de la mezcla de células con el colorante utilizando PBS.

Sembramos las células en una nueva botella a una densidad aproximada de  $2 \times 10^6$  células/ml y en presencia de medio de cultivo para alcanzar un volumen final de 15 ml. Incubamos las placas en una estufa a 37°C y con una concentración de CO<sub>2</sub> del 5% y las controlamos a diario para verificar su correcto estado, cambiando el medio de cultivo de ser necesario.

### **V. Transfección**

#### **V.a. Polietilimina (PEI)**

Realizamos la transfección de células U2OS, HCT116, MEF DKO y HEK293T mediante el uso de Polietilimina (PEI, Polysciences). El PEI es un polímero con unidades repetidas de grupo aminos. Este método se basa en que el PEI condensa ADN en partículas de carga positiva capaces de unirse a los residuos aniónicos de la superficie celular, y de esta manera ser introducidos en la célula a través de endocitosis. Una vez dentro de la célula se provoca una afluencia de contra-iones y una disminución del potencial osmótico, lo que resulta en un hinchamiento y estallido de la vesícula liberando el complejo ADN-polímero (*polyplex*) en el citoplasma. Cuando el *Polyplex* se

descomprime entonces el ADN es libre de difundir hacia el núcleo y ser transcrito. Efectuamos la transfección utilizando una relación 1  $\mu\text{g}$  DNA/ 7,5  $\mu\text{l}$  de PEI según la superficie a transfectar. Para cada muestra, preparamos los complejos de la siguiente manera:

	mw x 24	mw x 12	placa 35 mm	placa 60 mm	placa 100 mm
<b>OPTIMEM (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	17	34	50	100	300
<b>ADN total (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	0,7	1,5	2	4	12
<b>PEI (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	5	10	15	30	90

- 1) Se mezcla el/los vectores de expresión a utilizar con OPTIMEM sin suero ya que las proteínas interfieren con el reactivo.
- 2) Se agrega el PEI y se incuba por 8-10min a temperatura ambiente.
- 3) A la placa a transfectar se le retira la mitad del medio de cultivo y se agrega la mezcla de transfección.
- 4) Se incuban de 4-6 horas en estufa de cultivo celular a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>.
- 5) Se lavan las células con PBS y se agrega medio nuevo.
- 6) 24 horas post-transfección se procede al análisis celular.

#### V.b. Lipofectamina

Otro método de mayor eficiencia de transfección que se utilizó generalmente para los siRNA (ARN pequeños de interferencia) es Lipofectamina 2000 (Invitrogen), también lo utilizamos para transfectar las células empaquetadoras de viriones (ver Transducción viral). Este método se basa en la formación de complejos entre el ADN plasmídico y lípidos catiónicos, los cuales son endocitados al interior de las células. Efectuamos la transfección utilizando una relación  $\mu\text{g}$  DNA/  $\mu\text{l}$  de Lipofectamina 2000 de 1:3. Para cada muestra, preparamos los complejos de la siguiente manera:

	mw x 12	placa 35 mm	placa 60 mm
<b>OPTIMEM (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	100	250	500
<b>ADN total (<math>\mu\text{g}</math>)</b>	1,6	3	6
<b>siRNA 20 uM (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	1,6	3	6
<b>LIPO (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	2	7	15

- 1) Diluimos 1  $\mu\text{g}$  de vector total en 50  $\mu\text{l}$  de medio OPTIMEM sin suero, dado que el SFB puede afectar el correcto ensamblado de los complejos.

- 2) Diluimos 3  $\mu$ l de Lipofectamina 2000 en 50  $\mu$ l de medio OPTIMEM sin suero ni antibióticos, e incubamos durante 20 minutos a temperatura ambiente. La necesidad de que el medio no tenga antibióticos se debe a que éste podría presentar alta toxicidad celular durante la transfección.
- 3) Luego de la incubación, mezclamos la dilución del vector con la dilución de Lipofectamina 2000, mezclamos e incubamos 20 minutos a temperatura ambiente.
- 4) A la placa a transfectar se le retira el medio de cultivo, se lava con PBS y luego se agrega la mezcla de Lipo + ADN. Mezclamos la placa haciendo “ochos”.
- 5) Incubamos la placa en estufa durante 4 horas.
- 6) Se lavan las células con PBS y se agrega medio nuevo.
- 7) 72 horas post-transfección se procede al análisis celular.

El siRNA contra MageB2 es un *pool* de dos siRNAs diferentes: siB2 (#1 secuencia GCGAAGAUCUCUAACCAGTT, #2 secuencia AACUCAGCUACUGAGGAAGAG) y fueron comprados en *Eurofins Genomics*. siRNA control (siC) es un siRNA contra el gen de la luciferasa (secuencia CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT) de Qiagen.

## VI. Traduccion virales

Las partículas lentivirales se produjeron mediante la transfección de células empaquetadoras HEK 293T con un sistema de cinco plásmidos. Cuatro de éstos codifican la cápside y la transcriptasa reversa (gag/pol), la envoltura (vsv-G) y proteínas regulatorias (tat y rev). El quinto plásmido, es el que lleva la información que se desea transducir (*backbone*). Para los experimentos en U2OS se transdujieron con los vectores denominado pCCL-GFP como control y el vector pCCL-HA-MageB2. Para el establecimiento de la línea estable se utilizó la siguiente relación de los plásmidos:

<i>Backbone</i>	:	tat	:	rev	:	gag/pol	:	vsv-G
		20		1		1		1
				1		1		2

Sembramos células HEK 293T en botellas T25 para ser transfectadas. El agente de transfección elegido fue Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y fue utilizado según se detalla anteriormente, en una relación 10  $\mu$ l de Lipofectamina 2000 : 4  $\mu$ g de ADN total. Colectamos los sobrenadantes con partículas virales a las 48, 72 y 96 horas post-transfección y los filtramos utilizando filtros de 0.45  $\mu$ m *low binding* (Millipore).

24 horas antes de colectar el *primer* sobrenadante, sembramos las células a ser transducidas en un porcentaje para que quedaran confluentes al 85%. Realizamos tres rondas de transducción cada 24 horas utilizando los sobrenadantes filtrados y complementados con 1/3 de medio fresco con polibreno en una concentración final de 5 µg/ml para favorecer la adsorción de las partículas virales. 24 horas luego de la última ronda de transducción cambiamos el medio por medio estándar.

## **VII. Evaluación de proliferación**

### **VII.a. Curvas de crecimiento**

Las líneas estables de células o 72 horas post-transfección con siRNA fueron plaqueadas a una densidad de  $2 \times 10^4$  células por duplicado en placas de multiwell de 6 pocillos. Las muestras tomadas fueron fijadas con 10% de formalina a los distintos tiempos determinados por cada tipo de experimento. Se las tiñó con Cristal violeta 0.1% (Sigma-Aldrich) y se extrajo la tinción con 10% de ácido acético para leer la absorbancia a densidad óptica 595 nm, normalizando cada valor al día 0.

### **VII.b. Crecimiento independiente de anclaje**

Para realizar el ensayo de crecimiento independiente de anclaje, se utilizó la técnica convencional de clonado en medio semisólido descrita por Franken y col. (2006) con modificaciones menores. En la etapa final del crecimiento exponencial, las células fueron separadas del sustrato mediante la utilización de una solución de tripsina y resuspendidas en medio de cultivo completo. Se realizó una suspensión celular con una concentración de 1000 células/ml en medio de cultivo 2X suplementado con 20% v/v de suero bovino fetal. Luego, se mezclaron partes iguales de dicha suspensión y una solución precalentada a 40 °C de agar Noble 1% p/v en agua destilada, quedando así una concentración final de 500 células/ml en medio de cultivo 1X suplementado con 10% v/v de suero bovino fetal y una concentración 0,5% p/v de agar Noble. De esta última dilución se sembraron 2 ml en una placa de cultivo de 35 mm de diámetro (Falcon BD) previamente cubierta con 1 ml de una solución de agar Noble al 1% p/v. Luego, las placas se introdujeron en una heladera a 4 °C durante 30 min para permitir la solidificación de la capa superior de agar Noble. Posteriormente, se incubaron a 37 °C durante 14 días en cámara húmeda con una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Por último, se realizó el recuento bajo microscopio de las colonias obtenidas mediante el uso de un microscopio óptico CKX41 con una magnificación total de 40X. Para la identificación de las colonias formadas se estableció un criterio donde las mismas debían tener un mínimo de 50 células, mostrando un diámetro promedio de colonia de 60 µm.

Como control de la eficacia metodológica empleada se utilizó la línea celular U2OS parental. Se realizaron tres experimentos independientes por cada subcultivo estudiado. Los resultados se expresaron como el promedio del porcentaje de colonias formadas durante la experiencia. El mismo se calculó dividiendo el número de colonias formadas por placa por el número de células inoculadas inicialmente.

### **VII.c. Migración celular**

El ensayo de migración celular fue evaluado mediante la “técnica de cicatrización de herida” descrita por Liang y col. (2007) con modificaciones menores. En la etapa final del crecimiento exponencial las células fueron separadas del sustrato mediante la utilización de una solución de tripsina y resuspendidas en medio de cultivo completo. Posteriormente, se sembraron  $2,7 \times 10^4$  células /cm<sup>2</sup> en placas de cultivo de 35 mm de diámetro con un volumen final de 2 ml y fueron incubadas a 37 °C, permitiendo a los cultivos alcanzar la confluencia. Una vez obtenida, se cambió el medio suplementado por medio carente de suero, permaneciendo en estas condiciones durante 24 horas. Posteriormente, se procedió a realizar la herida con una punta plástica de una micropipeta mecánica de 200 µl. Una vez realizada, se agregó un volumen de 2 ml de medio sin suero, considerándose este momento como el tiempo 0. Se realizaron capturas fotográficas a las 0 y 24 y 48 horas del ensayo en los mismos puntos experimentales mediante el uso de una cámara Olympus anexada al microscopio óptico, la magnificación total para la obtención de las fotografías fue de 40X.

### **VII.d. Formación de colonias**

Este ensayo se basa en sembrar de forma muy diluída las células en placas de 100 mm de forma que de una única célula aislada proliferante comience a formarse la colonia. Así es que se luego de 72 horas de ser transfectadas con el siRNA contra MageB2 (siB) o su control (siC), las líneas U2OS, HCT 116 wt y p53 KO fueron tripsinizadas y sembradas en placa de 100 mm  $6 \times 10^4$  células. Cuando fueron visualizadas colonias se lavó las placas y luego de ser fijadas las células con 10% de formalina, se las tiñó con Cristal violeta 0.1% (Sigma-Aldrich) para su recuento.

Se realizaron tres experimentos independientes por cada subcultivo estudiado. Los resultados se expresaron como el promedio del porcentaje de colonias formadas durante la experiencia. El mismo se calculó dividiendo el número de colonias formadas por placa por el número de células inoculadas inicialmente.

## VIII. Análisis de proteínas

### VIII.a. Western Blot

#### ➤ SDS-PAGE

Se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry y colaboradores (1951) tras efectuar una dilución 1:40 en SDS 1% (p/v).

Se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de las proteínas de los lisados celulares, empleando el sistema discontinuo de Laemmli (1970). Para ello se usó una cuba electroforética (Miniprotean III, BioRad) y una fuente de poder (EPS 600, Pharmacia). En SDS-PAGE, empleando geles con tamaño de poro adecuado, la movilidad electroforética de las proteínas se basa en diferencias entre sus tamaños moleculares, dado que el tratamiento con SDS equipara la densidad de carga superficial de las mismas.

La concentración de monómero (T) en el gel concentrador fue de 4%: acrilamida 39 g/l; bisacrilamida 1 g/l; SDS 1 g/l en Tris-HCl 125 mM, pH 6,8. Como catalizador de la polimerización se empleó N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED  $\delta=0,77\pm 0,02$  g/l) 0,3 ml/l y persulfato de amonio 0,37 g/l como iniciador.

El T en el gel separador fue de 12%: acrilamida 117g/l; bisacrilamida 2,1 g/l; SDS 1 g/l; TEMED 0,3 ml/l; persulfato de amonio 0,37 g/l en Tris-HCl 375 mM, pH 8,8.

Las proteínas fueron solubilizadas en *buffer* de siembra (Tris-HCl 62,5 mM; pH 6,8; conteniendo SDS 2% (p/v); 2-mercaptoetanol 5% (v/v); glicerol 10% (v/v) y azul de bromofenol 0,01 g/l) por calentamiento a 95°C durante 5 min. Una masa determinada de proteínas fue sembrada en cada calle y en cada placa fue incluido un marcador de pesos moleculares preteñido (BioRad).

La electroforesis fue desarrollada a corriente constante de 80 V durante el proceso de isotacoforesis en el gel concentrador y de 120 V en el gel separador todo sumergido en el *buffer* de corrida (*SDS running Buffer* : Glicina 19 mM; Tris 2,5 mM; SDS 0,1%).

Una vez que se observa una separación adecuada del marker de proteínas que muestra bandas que van desde el peso molecular entre 10 KDa hasta 130 KDa, se procede a transferir las proteínas.

#### ➤ Electrotrotransferencia e *immunoblotting*

Las proteínas separadas por SDS-PAGE fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (NC) (*Hybond ECL*, Amersham Pharmacia Biotech). Para ello, se colocan 3 papeles de filtro 3 MM y por encima de este, se coloca la membrana de Nitrocelulosa, seguida del gel de

Poliacrilamida; y se vuelven a colocar por encima otros 3 papeles de filtro; todos previamente hidratados en el *buffer* de transferencia (Semidry Blotting *Buffer*: Tris 25 mM; glicina 195 mM; SDS 0,05%, pH 8,3; metanol 20%, v/v). Se coloca en un equipo de transferencia semi-húmeda (Mini Trans-Blot cell, BioRad) y se da corriente a 400 mA y 15 V durante 60 min. Durante todo el proceso se emplearon guantes para evitar contaminar las NC con proteínas externas.

Al finalizar la transferencia, las NC fueron lavadas varias veces con *buffer* TBS-T (Tris 25 mM; NaCl 137 mM; KCl 3 mM pH 7,4; Tween 20 0,1%). Los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados con leche descremada 5% en TBS-T (p/v) durante una hora. Luego, las NC fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con anticuerpo anti la proteína de interés diluidos 1:1000 con leche 5% en TBS-T.

Se utiliza la evaluación de actina como control de la cantidad de proteínas totales sembrada en cada calle, ya que es una proteína celular cuya concentración se mantiene constante en todas las células y no se modifica por los tratamientos.

Luego de tres lavados de 5 minutos cada uno en agitación con leche 5% en TBS-T, se procedió a incubar las NC durante 1 hora en agitación, en presencia de anticuerpo de conejo contra IgG de ratón o de conejo según correspondiera, conjugado con la enzima peroxidasa (de Amersham Pharmacia Biotech), diluido 1:5000 con TBS-T Leche 5%. Las proteínas no unidas fueron removidas mediante un procedimiento de lavado igual al anteriormente explicado con TBS-T.

Las bandas fueron reveladas por el método de quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) utilizando un equipo *Dark Box II Fujifilm Intelligent* (Fuji) acoplado a una cámara digital (LAS-1000). En la reacción enzimática ocurre oxidación del luminol en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por acción de la peroxidasa, obteniéndose un compuesto excitado que emite luz al retornar a su estado basal. La solución reveladora (Solución A: Tris-HCl 100mM pH8,7; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 volúmenes + Solución B: Tris-HCl 100mM pH8,7; Luminol 250mM en H<sub>2</sub>O; Ácido p-Cumárico 90mM en H<sub>2</sub>O, 1:1) posee fenoles para aumentar la luz emitida aproximadamente 1000 veces además de extender el tiempo de emisión de la misma. Las bandas se visualizaron mediante el uso del programa *Image Reader LAS-1000*.

➤ Anticuerpos utilizados para la detección de:

Proteína	Fabricación	Especie
MageB2	Casero producido en nuestro laboratorio (ver generación Ac)	conejo

<b>p53</b>	FL-393 policlonal de de Santa Cruz Biotechnology	ratón
<b>E2F1</b>	KH95 monoclonal de Santa Cruz Biotechnology	ratón
<b>c-Myc</b>	N-262 policlonal de Santa Cruz Biotechnology	conejo
<b>Nucleolina (C23)</b>	monoclonal de Zymed Laboratories	ratón
<b>Actina</b>	13E5 monoclonal de Cell Signaling Technology	conejo
<b>RP S6</b>	54D2 monoclonal de Cell Signaling Technology	ratón
<b>β-Tubulina</b>	D-10 monoclonal de Santa Cruz Biotechnology	ratón

<b>Etiqueta (Tag)</b>	<b>Fabricación</b>	<b>Especie</b>
<b>HA</b>	12CA5 monoclonal de Roche	ratón
<b>Flag</b>	M2 monoclonal de Sigma-Aldrich	ratón
<b>Myc</b>	9E11 monoclonal de Cell Signaling Technology	ratón
<b>GFP</b>	Casero producido en nuestro laboratorio	conejo

### VIII.b. Análisis de interacciones proteicas por Inmunoprecipitación

Las células ( $4 \times 10^6$ ) fueron lavadas 3 veces en PBS. Posteriormente, fueron lisadas con 500  $\mu$ l de *Buffer* de Lisis NP-40 (Tris HCl pH8 50mM; NaCl 150mM; NP-40 1%; 2  $\mu$ g/ml de Inhibidor de proteasas: PMSF 1 mM; aprotinina 1  $\mu$ g/ml y leupeptina 2  $\mu$ g/ml;  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM; EDTA 5mM; DTT 2mM). Luego de 10 min de incubación en hielo se levanta la muestra rastrillando toda la superficie. Se pasa todo el volumen a un tubo eppendorf con jeringa para romper aún más las células. Luego el material insoluble se remueve por centrifugación a 14000 g durante 10 min a 4°C. Se trasvasa el sobrenadante a un tubo limpio y se toma una alícuota de 50  $\mu$ l como muestra de Lisados totales (Input) a la cual se le agrega igual volumen de *Buffer* de siembra 2x para ser calentada a 95°C por 5 minutos.

Al resto del volumen de la muestra se le agrega el equivalente a 2  $\mu$ g del Anticuerpo anti la proteína de interés que será inmunoprecipitada y además se agregan 30  $\mu$ l de Proteína A-Sepharosa (Amersham Pharmacia Biotech) y se lo incuba en rotación constante por 3 horas a 4°C. Finalizado el tiempo de incubación se procede a realizar los lavados centrifugando la muestra por 3 minutos a 5000 rpm. Se descarta el sobrenadante y se resuspenden las beads en 1 ml de *buffer* de lisis IP-NP40. Se pone a rotar nuevamente durante 5 min a 4°C, y repetimos el procedimiento de lavado 2 veces más.



Por último se resuspenden las beads en 50 µl de *Buffer* de siembra para proteínas y se calienta la muestra a 95°C durante 5 minutos. Se procede a la detección de las muestras mediante la realización del Western Blot antes explicado.

### VIII.c. Análisis de localización celular por fraccionamiento subcelular

Se procesó una placa de 100 mm con células HCT116 al 95% de confluencia plaqueadas del día anterior. Las células fueron fraccionadas usando *buffers* hipotónicos y una serie de centrifugaciones diferenciales sobre colchones de sacarosa siguiendo el protocolo de Lamond (<http://www.lamondlab.com/f7nucleolarprotocol.htm>).

Una vez tripsinizadas las células, se las levanta con 5 ml de PBS frío para ser centrifugadas a 218 g a 4°C por 5 min. Se repite 2 veces el lavado y se resuspende el pellet obtenido con 5 ml de la solución A (SA: Hepes 10 mM pH 7,9; KCl 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; DTT 0,5 mM). Se incuba durante 10 minutos a 4°C durante los cuáles las células se hinchan sin romperse. Luego se trasbasa la muestra a un homogeneizador de tejido Dounce para romper las células de forma mecánica, de esta forma rompemos la membrana celular liberando todo el contenido citoplasmático y dejando los núcleos intactos. Centrifugando 218 g a 4°C por 5 minutos logramos dejar los núcleos en el pellet siendo el sobrenadante la fracción citoplasmática. El pellet está enriquecido con los núcleos pero no es completamente puro, por ello se procede a separar los núcleos limpios de las impurezas. Para ello, se resuspende el pellet en 3 ml de solución 1 (S1: Sacarosa 0,25 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM) y se vuelca lentamente sobre 3 ml de la solución 2 (S2: Sacarosa 0,35 mM; MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM) en otro tubo, hay que ser cuidadoso de mantener ambas capas de soluciones separadas. Se centrifuga a 1430 g a 4°C por 5 minutos y se obtiene un pellet de núcleos puros y limpios (el sobrenadante se descarta). Se continúa con el fraccionamiento nucleolar, para el cual se resuspende el pellet en 3 ml de S2 y se procede a sonicar la suspensión nuclear 6 veces de 10 segundos de pulsos (*Fisher Sonic dismembrator Model 300*, intensidad media seteado en 6) y 10 segundos de intervalo en hielo. En este punto se liberan los nucléolos, pero hay que tener cuidado con el exceso de sonicación que puede dañar los nucléolos. Luego, se vuelca la muestra sobre 3 ml de la solución 3 (S3: Sacarosa 0,88 mM; MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM) y se centrifuga a 3000 g a 4 °C por 10 minutos. De esta manera obtenemos el pellet conteniendo los nucléolos y el sobrenadante con la fracción nucleoplásmica. Para limpiar los nucléolos se resuspende el pellet en 0,5 ml de la S2 y se centrifuga a 1430 g a 4°C por 5 min, obteniéndose un pellet de nucléolos puros. En cada paso se agregó inhibidores de proteasas PMSF en las soluciones.

Para el análisis del fraccionamiento subcelular mediante Western Blot es necesario purificar y concentrar las proteínas de la fracción citoplásmica y nucleoplásmica mediante el uso de un protocolo de precipitación proteica con ácido tricloroacético (TCA). Tanto las proteínas precipitadas de ambas fracciones como el pellet conteniendo la fracción nucleolar pura se resuspenden en *buffer* de siembra para ser calentado, desnaturalizado y proceder a la corrida electroforética.

#### VIII.d. Purificación de Ribosomas

Los ribosomas citoplasmáticos o nucleares purificados a partir de células U2OS fueron obtenidos a partir de  $15 \times 10^6$  células plaqueadas el día anterior en placa de 150 mm. Como se explicó previamente obtuvimos la fracción citoplásmica en el sobrenadante de 3 ml de *buffer* hipotónico y la nucleoplásmica en el pellet, la cual fue purificada y finalmente resuspendida en 3 ml *buffer* Lisis Tritón X-100 (Tris-HCl 15 mM pH 7,5; NaCl 300 mM; MgCl<sub>2</sub> 6 mM; Tritón X-100 1%). Una vez sonicada la fracción nuclear procedimos a volcar cada una de las fracciones sobre colchones de sacarosa 30% en KCl 0,5 M. Se centrifugaron las muestras (en ultracentrífuga con el rotor SW 55 Ti) 100.000 g por 45 min a 4°C. El pellet de cada fracción es resuspendida en 50 µl de *buffer* de siembra para ser corridas en Western Blot.

#### ➤ Perfil de Polisomas en Gradiente continuo

En el caso de realizar el perfil de polisomas a partir de ribosomas citoplasmáticos ribosomales, el pellet obtenido de la purificación de los mismos se resuspendió en *buffer* CSKB (KCl 0,25M; Hepes 0,1M pH 6,8; EGTA 0,25M; MgCl<sub>2</sub> 1M) y se volcó la muestras sobre el gradiente de sacarosa continuo (10-40%) armado en forma manual. En este gradiente continuo, las partículas se separan en función de su velocidad de sedimentación en un medio de densidad uniformemente baja. Durante la centrifugación los componentes de la muestra se separan en una serie de bandas o zonas, con una velocidad de sedimentación característica. La velocidad a la cual las partículas sedimentan depende del tamaño y la densidad (densidades en un rango muy angosto: lípidos < proteínas < RNA).

Preparamos un gradiente de siete capas de diferente concentración de sacarosa en CSKB (10 a 45 % tomadas de a 5 %). Según sea el rotor que se utilice, será el volumen de los tubos utilizados, en este caso para rotores SW 55 Ti el volumen total es de 5 ml, para los cuáles se colocan 0,5 ml de sacarosa 45 % en CSKB un el tubo de centrifuga, dejando deslizar la gota contra la pared. Se congela en freezer de -70 °C durante 10 minutos. Luego se agregan 0,5 ml de la siguiente solución de % decreciente (40 %) sobre la capa congelada anterior. Se prosigue de igual

manera con cada capa. Una vez agregada la última capa, se sella el tubo con film autoadherente y se deja a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta la noche previa a su utilización, momento en el que se deja incubando a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el día siguiente para que se homogeneicen las capas y se genere el gradiente continuo.

La muestra se coloca deslizando gota a gota sobre la pared del tubo, siendo cuidadoso de mantener las diferencias de densidad. De esta manera queda un volumen final de 4,5 ml en el tubo que será centrifugado y recolectado en fracciones de a 0,3 ml para determinar la distribución de ARNr. Se tomó una alícuota de 50  $\mu\text{l}$  de cada una de las fracciones del gradiente para medir la Absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro de placa. Se graficó la Absorbancia para cada fracción. Y además con el resto del volumen de cada fracción se precipitaron las proteínas con TCA y se resuspendieron en *buffer* de siembra para su análisis por Western Blot.

#### **VIII.e. Precipitación proteica con ácido tricloroacético (TCA)**

Se agrega igual volumen de 20% TCA a la muestra proteica. Se deja incubando por 30 minutos. Se centrifuga a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos para poder remover el sobrenadante. Se agrega al pellet 0,3 ml de acetona fría y se centrifuga a  $4^{\circ}\text{C}$  por minutos, paso que se repite 2 veces. Se remueve el sobrenadante y se deja secar el pellet para ser resuspendido con el *buffer* adecuado.

Nota: el TCA es un fuerte ácido que tiene que ser manipulado con mucho cuidado.

#### **VIII.f. Ensayo de estabilidad de proteica de MageA2**

##### ➤ Tratamiento con cicloheximida (CHX)

La CHX es un inhibidor de la biosíntesis de proteínas producida por la bacteria *Streptomyces griseus*. Esta droga es utilizada como una herramienta experimental en biología molecular para determinar la vida media de una proteína, al ejercer su efecto interfiriendo en la etapa de traducción de la síntesis de proteínas *de novo*. De esta manera es capaz de bloquear la elongación traduccional y en consecuencia permite independizarse del proceso transcripcional. Además dado que la cicloheximida es un eficaz inhibidor de la biosíntesis de proteínas sólo en eucariotas, puede ser utilizado para distinguir entre las proteínas traducidas en las mitocondrias y las proteínas traducidas en el citosol. De esta manera, el tratamiento con CHX se basa en el análisis mediante Western Blot de la vida media de la proteína de interés durante el transcurso de una curva de tiempo determinado. Se utilizaron células HEK293T crecidas en placas de 6 pocillos. Todos los pocillo por placa fueron transfectados transientemente con HA-MageA2 (0,3  $\mu\text{g}$ ) + un vector vacío (VV) o HA-MageA2 + HA-ARF o Myc-L11 o HA-NPM respectivamente, en iguales

concentraciones (0,3 µg). A las 24 horas post-transfección se removió el medio de las células de sólo uno de los pocillos por cada placa y se agregó medio fresco con el agregado de 10 µM de CHX. Este pocillo corresponderá al tiempo de tratamiento de 10 horas. A las 2 horas transcurridas se remueve el medio de un segundo pocillo por cada placa y nuevamente se agrega el medio con el agregado de 10 µM de CHX (esta muestra corresponde al tiempo de 8hs); el mismo procedimiento se repite 3 veces más (obteniendo las muestras correspondientes a los tiempos 6, 4 y 2 hs), dejando el último pocillo sin tratar con CHX que corresponderá al tiempo 0. En ese momento se levantan cada una de las muestras de las distintas placas con *buffer* de siembra, se calientan a 95°C por 5 minutos y se procede al Western Blot, sembrando por gel las muestras control correspondientes a la placa transfectada con HA-MageA2 + VV, y por cada gel, las muestras de una de las placas co-transfectadas. Se revela igual al siguiente ensayo.

➤ Co-transfecciones

El otro ensayo que se realizó para analizar la estabilidad de HA-MageA2 se realizaron sobre células de la línea celular HEK293T crecidas en placas de 6 pocillos. Se co-transfectaron transitoriamente iguales cantidades de HA-MageA2 (0,30 µg) y concentraciones crecientes de HA-ARF, Myc-L11 o HA-NPM (0,25, 0,50, 0,75 y 1 µg). A las 24 horas post-transfección las células fueron levantadas con *buffer* de siembra, calentadas y sembradas para realizar el Western blot.

Las membranas NC fueron cortadas para poder incubar con los anticuerpos correspondientes. En caso de ser necesario (por coincidencia en el peso molecular de las proteínas a detectar) las membranas fueron reincubadas con el anticuerpo correspondiente. Se revela la proteína actina como control de carga y para relativizar las bandas obtenidas.

➤ Tratamiento con Tricostatina A (TSA)

Tricostatina A (TSA) es un conocido inhibidor reversible de HDACs. El tratamiento con TSA se realiza 24 horas post-transfección de las células. Para ello se remueve el medio para agregar medio fresco con el agregado de 300 nM de TSA y se incuba durante 24 horas para proceder al ensayo requerido.

### VIII.g. Inmunofluorescencia

Se cultivan las células sobre vidrios cubreobjetos en placas de 12 o 24 pocillos al 50% de confluencia, una vez adheridas las células son transfectadas con los vectores que expresan las proteínas de interés. 24 hs post-transfección se descarta el medio de cultivo y se realizan 3 lavados

con PBS 1X. Se fijan las células mediante el agregado de paraformaldehído 4% en PBS durante 10 minutos, luego de los cuáles se realiza un lavado con PBS y posterior incubación de los vidrios con Glicina 100 nM + Sodio Azida 0,02% en PBS durante 5 minutos para frenar el efecto del paraformaldehído. Luego de otro lavado, se procede a permeabilizar las células, incubándolas con detergente Tritón X-100 0,1% en PBS, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se procede a lavar dos veces con PBS, para eliminar restantes de detergente, y se realiza el bloqueo incubando los wells con 0,5 ml de una solución de Seroalbúmina Bovina (BSA) al 1 % en PBS Tween, durante media hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se detallan en las tablas a continuación. La incubación con el anticuerpo primario específico para cada proteína en estudio se realizó utilizando 20 µl de una dilución 1:50 de dicho anticuerpo en PBS. Los vidrios se dan vuelta sobre la gota y se los incuba durante 1 hora a 37°C. Luego, se realizan 3 lavados de 5 minutos con PBS para remover el exceso de anticuerpo primario e incubamos de igual manera con el anticuerpo secundario en oscuridad por 45 minutos a 37°C, este anticuerpo reconoce al IgG del anticuerpo primario y se encuentra conjugado al fluoróforo de color deseado. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se lavan 3 veces más con PBS y se agrega sobre los vidrios 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 0,1 µg/ml para marcar los núcleos de todas las células, por 10 minutos a temperatura ambiente. Por último se lavan los vidrios con H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> para eliminar excesos de DAPI y montamos los cubreobjetos con 5 µl de solución de montaje Mowiol/Dabco, dejamos secar un día y sellamos con esmalte de uñas transparente. Conservamos en frío y en oscuridad hasta observar al microscopio.

Obtuvimos las imágenes utilizando un microscopio confocal Olympus IX81/Fluoview FV 1000 y las procesamos con el software ImageJ 1.47v.

Los anticuerpos primarios utilizados son los mismo detallados en la sección de Western Blot en una dilución 1:50.

➤ Los anticuerpos secundarios utilizados se detallan a continuación:

Anticuerpo	Especie	Fluoróforo	Empresa	Dilución
Anti-IgG Ratón	Cabra	Alexa Fluor® 488	Life Technologies	1:1000
Anti-IgG Ratón	Cabra	Alexa Fluor® 568	Life Technologies	1:1000
Anti-IgG Conejo	Cabra	Alexa Fluor® 568	Life Technologies	1:1000

## IX. Evaluación de la expresión génica

### IX.a. Ensayos de genes reporteros

Se lava las células 2 veces con PBS 24 horas post-transfectadas con los correspondientes vectores reporteros. Se les agrega *Buffer* de Lisis (Tritón X-100 0,2%; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM pH 7.8; DTT 1 mM) y se deja incubando 10 min a temperatura ambiente, luego se congela la placa a -20°C. Cuando son descongeladas se levantan las muestras con la pipeta y se siembran en una placa mw de 96 pocillos blanca por duplicado, ya que una de esos duplicados corresponderá a la lectura de la actividad Luciferasa Firefly y el otro la del Renilla que se expresa bajo un promotor de forma constitutiva para poder relativizar cada una de las muestras.

Para placas de 12 pocillos agregamos 120 µl de *buffer* lisis por pocillo y se utilizan 40 µl por cada medición de actividad luciferasa. El volumen restante de ambos duplicados de las muestras se recolectan juntos y se les agrega *buffer* de siembra 2x, se las calienta para desnaturalizar las proteínas y analizarlas por Western Blot. En el caso de placas de 24 pocillos se agregan 80 µl del *buffer* lisis por pocillo y se siembran 30 µl para las mediciones de las actividades de las distintas luciferasas, juntando el remanente de los triplicados para ser analizados por Western Blot.

#### ➤ Medición de la actividad Luciferasa Firefly

Las muestras se siembran en placa de 96 pocillos blanca especial para luminómetro de placa (*Glomax Multi Detection System, Promega*) a las cuales se les agrega el reactivo con el sustrato necesario para que la luciferasa *Firefly* catalice la reacción y se emita la luminiscencia correspondientes a cada muestra. Este reactivo es casero y lo preparamos en el momento de ser utilizado para la cantidad de muestras necesarias (Glicinglicina 25 mM, MgSO<sub>4</sub> 15 mM, EGTA 4 mM, Tritón x-100 0,27% v/v, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 15 mM, ATP 0,2 mM, DTT 1 mM y luciferina 0,1 mM). Se incuba por 10 minutos a temperatura ambiente y se mide la actividad de la enzima luciferasa durante 1 segundo por pocillo.

#### ➤ Medición de la actividad Luciferasa Renilla

Idem anterior pudiendo hacerse en la misma placa, ya que el reactivo necesario para la luciferasa *Renilla* es la coelenterazina-h (*Promega*) que es más estable. Por lo que primero se agrega este reactivo a una concentración 5 µM final y se deja incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente.

### IX.b. Evaluación de los niveles de ARN mensajero

#### ➤ Extracción y cuantificación de ARN

Se realiza la extracción de ARN total utilizando Trizol (Invitrogen). El reactivo de Trizol está compuesto por una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina y otros compuestos que facilitan el aislamiento de los diversos tipos de ARN. Para el aislamiento, se descartamos el medio de cultivo de la placa que contiene las células y se agregan 0,5 ml de Trizol por placa de 3,5 cm de diámetro, se levantan utilizando un rastrillo de goma (*scraper*) y se incuban por 5 minutos a temperatura ambiente. Se coloca la muestra en un tubo eppendorf y se agregan 200  $\mu$ l de cloroformo por cada 1 ml de Trizol, agitando vigorosamente por 15 segundos. Se incuban a temperatura ambiente por 2-3 minutos. Se centrifuga el tubo a 12000 g durante 15 minutos a 4°C, de esta manera se obtienen tres fases visibles: una superior acuosa que contiene el ARN, una interfase y una fase inferior roja compuesta por fenol-cloroformo.

Se transfiere la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf y agregamos 0,25 ml de isopropanol por cada 1 ml de Trizol. Se incuban 10 minutos a temperatura ambiente para favorecer la precipitación del ARN y se centrifuga a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C, luego de los cuales se observa un precipitado blanco tipo gel correspondiente al ARN. Se descarta cuidadosamente el sobrenadante y se lava el pellet con 0,5 ml de etanol 75%. Se homogeneiza con *vortex* y se centrifuga a 7500 g durante 5 minutos a 4°C. Se descarta el sobrenadante y se deja secar el pellet por 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Por último, se resuspende el pellet en 30  $\mu$ l de agua libre de ARNasa y preservamos el ARN purificado a -80 °C.

Para realizar la cuantificación del ARN utilizamos el equipo NanoDrop, un espectrómetro de amplio espectro (220-750 nm) que mide 1  $\mu$ l de muestra con alta eficiencia y reproducibilidad. Se coloca 1  $\mu$ l de muestra en la punta de la fibra óptica y, en segundos, el equipo otorga la concentración de la misma, la cual puede estar en un rango de 2 a 3000 ng/ $\mu$ l. La concentración se obtiene por la medición de la absorbancia cuando la muestra es excitada a 260 nm., longitud de onda a la que absorben los ácidos nucleicos. El equipo también evalúa la absorbancia a 280 nm, longitud de onda a la que absorben también las proteínas debido a sus residuos aromáticos, y se calcula la relación 260/280, que debe ser superior a 1.8 para ser considerada de una pureza aceptable.

➤ Retrotranscripción

Para la síntesis del ADNc se utiliza la enzima transcriptasa reversa del virus M-MLV (Promega). Esta enzima utiliza como molde ARN o ADN simple cadena en presencia de un *primer* para sintetizar la hebra de ADNc. Para todas las reacciones, partimos de 1 µg de ARN para una masa representativa y homogénea del cultivo celular. Se realiza la reacción en dos pasos: primero, se alicuota en un tubo el ARN con los *primers* correspondientes, según:

<b>ARN</b>	1 µg
<b>Oligo dtt primers</b>	1 µl
<b>Volumen final con H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub></b>	5 µl

Incubamos a 70°C por 5 minutos en un termociclador (Bio-Rad) para desnaturalizar el ARN y romper las posibles estructuras secundarias que pudieran haberse formado. Luego, agregamos 15 µl de la mezcla de retrotranscripción, compuesta por:

<b>Buffer 5x</b>	4 µl
<b>dNTP 10 mM</b>	1 µl
<b>RT-MMLV</b>	1 µl
<b>RNA sin</b>	2 µl
<b>H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub></b>	7 µl

Incubamos a 25°C por 5 minutos y luego a 37°C por 60 minutos, tiempo en el cual la enzima cataliza la síntesis del ADNc. Por último, calentamos a 70°C por 15 minutos para inactivar la enzima.

➤ PCR cuantitativa en tiempo real

Se utiliza la técnica de RT-qPCR para evaluar los niveles de expresión de los ARNm de los genes en estudio o los genes blanco de los mismos. Llevamos a cabo la amplificación de ADNc por *Real Time qPCR* con *primers* específicos en el termociclador Opticon Real Time DNA Engine



(Bio-Rad), utilizando la mezcla SYBR Mix qPCR (ROCHE®). Ésta cuenta con el *buffer* adecuado, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, la enzima Maxima® Hot Start Taq ADN polimerasa, así como el fluoróforo SYBR Green, necesario para detectar el producto de amplificación. La ventaja del uso de esta enzima es que se encuentra modificada para que su actividad comience una vez que haya transcurrido el primer ciclo de desnaturalización de la PCR, ya que su sitio activo se encuentra bloqueado mediante un anticuerpo. Debido a esto, estas ADN polimerasas evitan la elongación de productos inespecíficos previo al inicio de la PCR. El esquema de reacción fue el siguiente:

<b>Iniciación</b>	94°C	5 minutos	} 40 ciclos
<b>Desnaturalización</b>	94°C	30 segundos	
<b>Hibridación</b>	60°C	30 segundos	
<b>Enlongación</b>	72°C	2 minuto	
<b>Curva de <i>melting</i></b>	78°		

Como se indica en la tabla, el esquema de reacción contempla la confección de una curva de *melting* inmediatamente finalizada la amplificación, utilizando una tasa de transición de temperatura lineal de 0,3°C/s de 60°C a 90° con adquisición continua de fluorescencia. La misma siempre presentó un único pico para todos los *primers* utilizados, indicando la presencia de un único producto de PCR. Confirmamos el correcto tamaño del producto de amplificación y la presencia de una única banda mediante electroforesis en gel de agarosa 2%.

Previo a la reacción, se realiza una dilución del ADNc de 1/10 en H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub>. Luego, en cada tubo de las strips utilizadas colocamos una mezcla compuesta por los siguientes componentes:

<b>H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub></b>	4,25 µl
<b><i>Primer Forward</i></b>	0,5 µl
<b><i>Primer Reverse</i></b>	0,5 µl
<b>Mezcla real qPCR</b>	6,25 µl
<b>ADNc</b>	2 µl

➤ Primers utilizados

Nombre del gen	Primer	Secuencia (5'-3')	Especie
<b>MageB2</b>	Forward	CCTGACTTCCGCTTTGGAGGCG	humano
	Reverse	ATCTCGGGCCTTGCGGCGTT	
<b>MCM6</b>	Forward	ATCCCTCTTGCCAAGGATT	Humano
	Reverse	GAAAAGTTCCGCTCACAAGC	
<b>CycE1</b>	Forward	TGAGCCGAGCGGTAGCTGGT	Humano
	Reverse	GGGCTGGGGCTGCTGCTTAG	
<b>CycD1</b>	Forward	ACGGCCGAGAAGCTGTGCATC	Humano
	Reverse	CCTCCGCCTCTGGCATT TTTGGAG	
<b>CDK1</b>	Forward	CATGGCTACCACTTGACCTGT	Humano
	Reverse	AAGCCGGGATCTACCATAACC	
<b>Pre-ARNr</b>	Forward	CCGCGCTCTACCTTACCTAC	Humano
	Reverse	CAGCGACCAAAGGAACCATA	
<b>ARNr 18S</b>	Forward	GTAACCCGTTGAACCCCAT	Humano
	Reverse	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	
<b>GAPDH</b>	Forward	ACAGCCTCAAGATCATCAG	Humano
	Reverse	GAGTCCTTCCACGATACC	

➤ Precauciones para mantener la calidad de los procedimientos

Todos los procedimientos previamente descritos para las técnicas de RT-PCR y *Real Time* PCR fueron realizados en gabinete de seguridad biológica tipo II empleando guantes descartables con el objeto de evitar la introducción de ARNasas foráneas. El material plástico descartable utilizado para la extracción de ARN así como para las reacciones de RT-PCR, fue adquirido libre de enzimas que degradan ADN (ADNasas) y ARN (ARNasas). Y además, todo el material plástico fue esterilizado por autoclavado. El material plástico no descartable, así como la cuba electroforética fueron tratados con una solución de NaOH 0,5 M durante 10 min con el objeto de inactivar ARNasas. Posteriormente, fueron enjuagados con H<sub>2</sub>O-DEPC.

➤ Análisis de los datos

Analizamos los datos crudos utilizando el programa MJ Opticon Monitor Software 3.1.32 (Bio-Rad). La expresión génica fue normalizada a la del gen de la Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La cuantificación de la expresión génica relativa fue calculada usando el método  $\Delta\Delta C_t$  (*Methods and Applications Guide Introduction to Quantitative PCR Introduction to Quantitative PCR Methods and Applications Guide*, n.d.). Realizamos al menos dos duplicados de al menos dos muestras independientes para cada experimento y un blanco sin cDNA. En cada ensayo de amplificación fue incluido un control negativo en el cual se excluyó el agregado de ADNc. El objetivo de este control fue comprobar que los diferentes reactivos empleados no se hubieran contaminado con ADN externo.

## X. Tratamiento estadístico

Utilizamos el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) utilizando el programa StatView 5.0 (SAS Institute Inc. Cary, NC), para realizar las comparaciones estadísticas de los siguientes ensayos: curva de cinética de crecimiento, formación de colonias, ensayos de genes reporteros, RT-qPCR.

Para probar la homogeneidad de las varianzas se utilizó la prueba de Levene y para corroborar la normalidad de los datos se utilizó la comparación gráfica de la distribución de las medias. En caso de encontrar valores del ANOVA estadísticamente significativos se utilizó la ensayo de Tukey como prueba *a posteriori*. Diferencias de hasta  $p$  menor a 0,05 fueron consideradas estadísticamente significativas.

Los resultados se expresan como media aritmética y desvío estándar de la media (Media  $\pm$  SEM) como medidas de tendencia central y de dispersión de al menos 3 experimentos independientes.

## XI. Clonados

➤ Extracción de ADN genómico a partir de células

Se utilizaron células U2OS para la extracción de ADN genómico, a las cuales luego de 3 lavados con PBS y posterior centrifugación a 100 rpm por 5 minutos, se agregó al pellet un volumen de fenol: cloroformo: isoamílico (24:25:1), se mezcló por inversión, se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C y se recuperó la fase acuosa. La misma fue nuevamente tratada con

fenol: cloroformo: isoamílico (1:1), mezclada y centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Luego se agregaron 1:10 de volumen de acetato de sodio (AcNa) 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto, y se incubó 1 hora a -70°C. Posteriormente se centrifugó a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado 2 veces con 600 µl de etanol 70%. Luego el pellet fue secado a temperatura ambiente y resuspendido en 50 µl de agua deionizada por 16 horas a 4°C. Finalmente se corroboró la integridad del ADN obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa 1% y se cuantificó la muestra por absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro.

➤ PCR a punto final

Realizamos la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a punto final utilizando la ADN polimerasa Taq (Invitrogen). Las reacciones fueron llevadas a cabo en el equipo termociclador (BioRad). Analizamos el producto de amplificación mediante electroforesis en un gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio para poder visualizar las bandas de ADN a luz UV. Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl conteniendo: 2 µl de ADN genómico o 20 ng de ADN plasmídico, según correspondiera, *Buffer* de la enzima Taq ADN polimerasa *Green Go Taq 5X* (Promega), dNTPs 200 µM (cada uno), 10 µM de *primers Forward/Reverse* y 1 unidad de la enzima Taq. Utilizamos el siguiente esquema de ciclos de amplificación:

<b>Iniciación</b>	94°C	5 minutos	} 30 ciclos
<b>Desnaturalización</b>	94°C	1 minuto	
<b>Hibridación</b>	60°C	1 minuto	
<b>Enlongación</b>	72°C	1 minuto	
<b>Enlongación final</b>	72°C	10 minutos	

Los *primers* utilizados se detallan en la siguiente tabla:

<b>Amplión</b>	<b>Primer</b>	<b>Secuencia del primer (5'-3')</b>	<b>ER</b>	<b>Tamaño</b>
<b>MageB2</b> <b>1-109</b>	Forward	CTATCTAGACTACATGTTAGAGGACTTTTG	XhoI	109 nt  603 nt
	Reverse	CTAGGATCCATGACTCCGGCTTTCTCTTCAT	BamHI	
<b>MHD-</b> <b>MageB2</b>	Forward	CTACTCGAGTTGGTGCAGTTCCTGTTGTAC	XhoI	
	Reverse	CTAGGATCCATGACTCCGGCTTTCTCTTCATC	BamHI	

<b>ΔNoLS- MageB2</b>	Forward	CTACTCGAGACCATGGTCACTGAAGCAGAG	XhoI	870 nt
	Reverse	CTAGGATCCATGACTCCGGCTTTCTCTTCAT	BamHI	
<b>GST- MageB2</b>	Forward	CTAGGATCCACTGAAGCAGAGGAAGAAGA	BamHI	258 nt
	Reverse	CTACTCGAGCCCTGACTTCCTGGTTAGA	XhoI	
<b>pMageB2</b>	Forward	CTACTCGAGTCTGAATCCCCTTCATTCCACC	XhoI	1695 nt
	Reverse	CTAAAGCTTGCTGGGATTACAGGCGCCCGC	HindIII	

➤ Análisis de los productos de amplificación

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 2% (p/v). Cada producto de PCR (10 µl) fue mezclado con 4 µl de *buffer* de siembra (azul de bromofenol 0,25%, p/v; sacarosa 4%, p/v en *buffer* TEB) y sembrado en el gel. En sendas calles, se sembraron un marcador de pb (Biodynamics SRL) para realizar el control del tamaño de los fragmentos amplificados y un control negativo de PCR. La electroforesis se desarrolló a 80 V durante 20 min en una cuba electroforética Liberty 2 (Biokey American Instruments Inc). Los productos de amplificación obtenidos fueron detectados mediante la observación en transiluminador de las señales emitidas por el bromuro de etidio intercalado en el ADNc. Los geles fueron fotografiados empleando una cámara digital (Kodak DC 120) y las fotografías, analizadas utilizando dos programas para digitalización de imagen (Array Gauge e Image Gauge, Fujifilm).

➤ Reacción de digestión

Se realizan 2 reacciones independientes para el vector y para el inserto correspondiente. Para los cuales se realiza una doble digestión a 37°C durante 90 minutos.

La reacción de digestión se compone de la siguiente manera:

<b>Buffer 10x</b>	1 µl
<b>ER #1</b>	1 µl
<b>ER #2</b>	1 µl
<b>Templado</b>	2 µg
<b>Volumen final con H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub></b>	10 µl

La elección de las enzimas de digestión se basó en tres aspectos:

- i. según las Enzimas de restricción (ER) que se encuentran en el sitio de clonados múltiples de los vectores donde se clona, convenientemente manteniendo el marco de lectura.
- ii. tratando de encontrar dos ER capaces de digerir en una misma reacción, es decir que corten del 75 al 100% en un mismo *Buffer*.
- iii. y que esas ER no corten al oligonucleótido en cuestión.

Una vez finalizada la reacción de digestión, se realiza la purificación de los productos cortados.

➤ Purificación de los productos de PCR y vectores digeridos: ADN Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Si la purificación se realiza a partir de una electroforesis preparativa, se escinde la banda de interés visualizada con transiluminador intentando llevar la menor cantidad de agarosa posible, debido a que ésta podría disminuir el rendimiento de la purificación. Se coloca a 65 °C adicionando igual volumen que gramos de gel cortado de *solution binding membrane* (SBM). El protocolo utilizado se basa en la disolución de la agarosa y la retención del DNA en una columna para su posterior elución. Si la purificación se realiza es a partir de una reacción de PCR, se agrega directamente 200 µl de SBM.

Luego, se trasvasa la mezcla a una columna, provista por el kit, y al minuto se centrifuga a 14.000 rpm por un minuto. El ADN se encuentra adherido a la resina que queda retenida en la columna. Se descarta el sobrenadante y se agregan 700 µl de *membrane wash solution* (MWS). Se elimina el sobrenadante luego de centrifugar a 14.000 rpm y se adicionan 500 µl de MWS. Nuevamente se elimina el sobrenadante por centrifugación a 14.000 rpm por un minuto. Estos 2 lavados con el *Buffer* MWS aseguran la eliminación completa de las sales, que podrían causar problemas en subsiguientes reacciones enzimáticas, como la ligación. Descartamos el filtrado y centrifugamos 1 minuto más a 12.000 g para asegurarnos la elución completa del filtrado.

Se coloca la columna en un tubo eppendorf limpio y se eluye el ADN con 20 µl de agua libre de nucleasas centrifugando una vez más a 12.000 g por 1 minuto. Este eluido corresponde al ADN purificado. Cuantificamos el vector purificado utilizando el NanoDrop y, además, se lo analiza en un gel de agarosa 1% para verificar su tamaño y calidad. Se guarda a -20 °C hasta su utilización.

➤ Hibridización de los oligonucleótidos NLS

Obtuvimos los oligonucleótidos correspondientes a las hebras sentido y antisentido (NLS-UP y NLS-DW) de la secuencia de localización nuclear. Que fueron diseñados a partir de bibliografía de la secuencia NLS de la proteína viral de HIV.

Para la hibridización reconstituimos los oligonucleótidos liofilizados en H<sub>2</sub>O<sub>mQ</sub> a una concentración final de 2 nmol/μl, tomamos 10μl de cada oligo y se agrega 80μl de *Buffer* TE (concentración final de cada oligo: 0,1nM/μl). Se lleva la mezcla a 95°C por 5 minutos y se deja enfriar lentamente (3 hs aproximadamente).

El ADN doble cadena obtenido contiene extremos compatibles con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI y fue ligado al vector pcDNA3-HA-Mage-A4 entre la secuencia del epítoto HA y el 5' del ORF de MageA4.

➤ Reacción de Ligación de los oligonucleótidos doble cadena en el vector

Una vez obtenidos los vectores y los insertos digeridos, purificados y cuantificados; realizamos la reacción de ligación con la enzima Ligasa de ADN T4 (Promega), según:

Inserto de oligonucleótidos	0 - 3:1 - 5:1
Vector	50 ng
<i>Buffer</i> de ligación 10x	1 μl
Ligasa de ADN T4	1 μl
Volumen final con H <sub>2</sub> O <sub>mQ</sub>	10 μl

La cantidad de Inserto depende de la relación que se quiera entre inserto:vector y del tamaño y cantidad de vector que se utilice. La relación es:

$$\text{cc. de Inserto} = \frac{50 \text{ ng. Vector digerido} \times \text{Tamaño de Inserto (pb)} \times \text{relación inserto:vector}}{\text{Tamaño de Vector (pb)}}$$

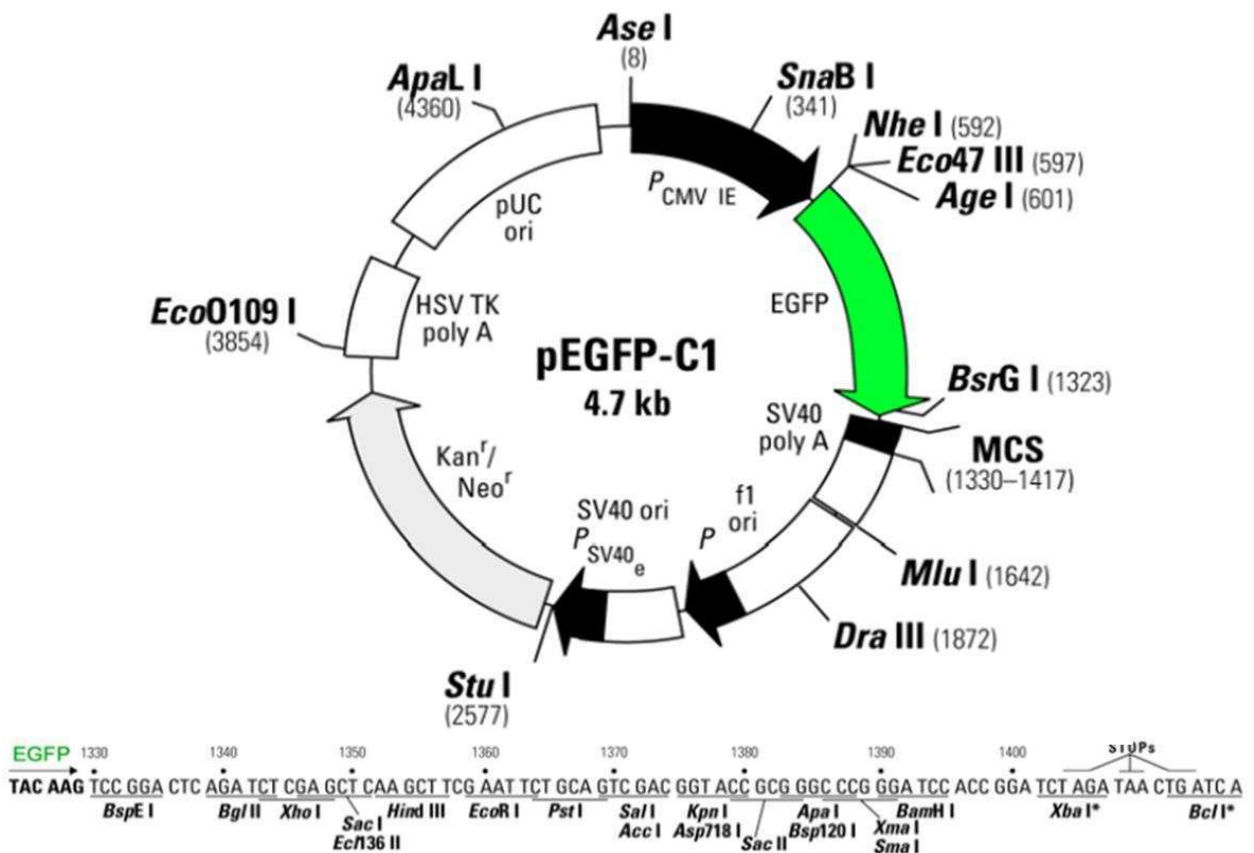
Así es que por cada clonado realizamos 2 o 3 reacciones de ligación: una como control negativo en la cual no se agrega el inserto (podemos obtener colonias por vector religado y/o no digerido); y una o dos ligaciones con las relaciones inserto:vector 3:1 o 5:1 respectivamente. Se incubaba a 16°C en termobloque toda la noche y, al día siguiente se transforman bacterias ultracompetentes con todo el volumen de la reacción de ligación.

## XII. Descripción de los vectores

### XII.a. Vector pEGF-C1

Este vector contiene una proteína GFP (*green fluorescent protein*) que será fusionada río abajo de la proteína a clonar. Por ello como el sitio de traducción comienza en el codón de iniciación de la GFP, hay que tomar los recaudos necesarios para mantener a nuestra proteína en marco de lectura.

En este vector se clonan las distintas construcciones de MageB2 (MHD,  $\Delta$ NoLS y 1-109). Para los cuales se utilizaron distintos *primers forward* con el agregado de la secuencia de corte reconocida por XhoI y, en todos los casos, el mismo *primer reverse* con la secuencia para el reconocimiento de BamHI.



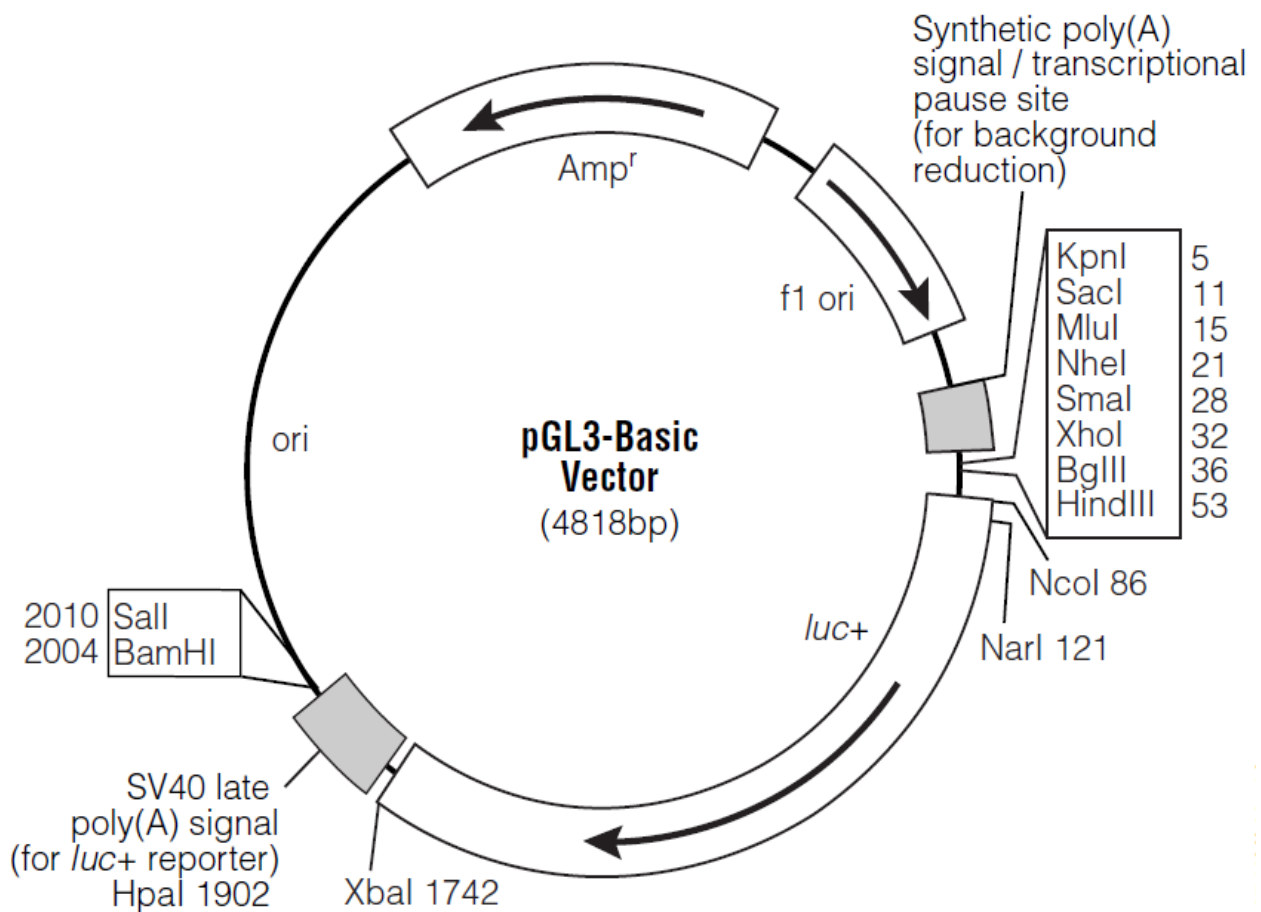
**Figura M.1:** Mapa del vector pEGFP-C1. El sitio de clonados múltiples (MCS) se describe secuencialmente abajo.



### XII.b. Vector pGL3(Basic)-Luc

Este vector está diseñado especialmente para ensayos de genes reporteros, ya que contiene el gen de la luciferasa río arriba del sitio de clonados múltiples dónde se clonan las secuencias promotoras de interés. En este caso no es necesario prestar atención al marco lectura..

Se utilizó este vector para clonar alrededor 1500 bases correspondientes al promotor de MageB2, para el cual se utilizaron las ER XhoI y HindII.

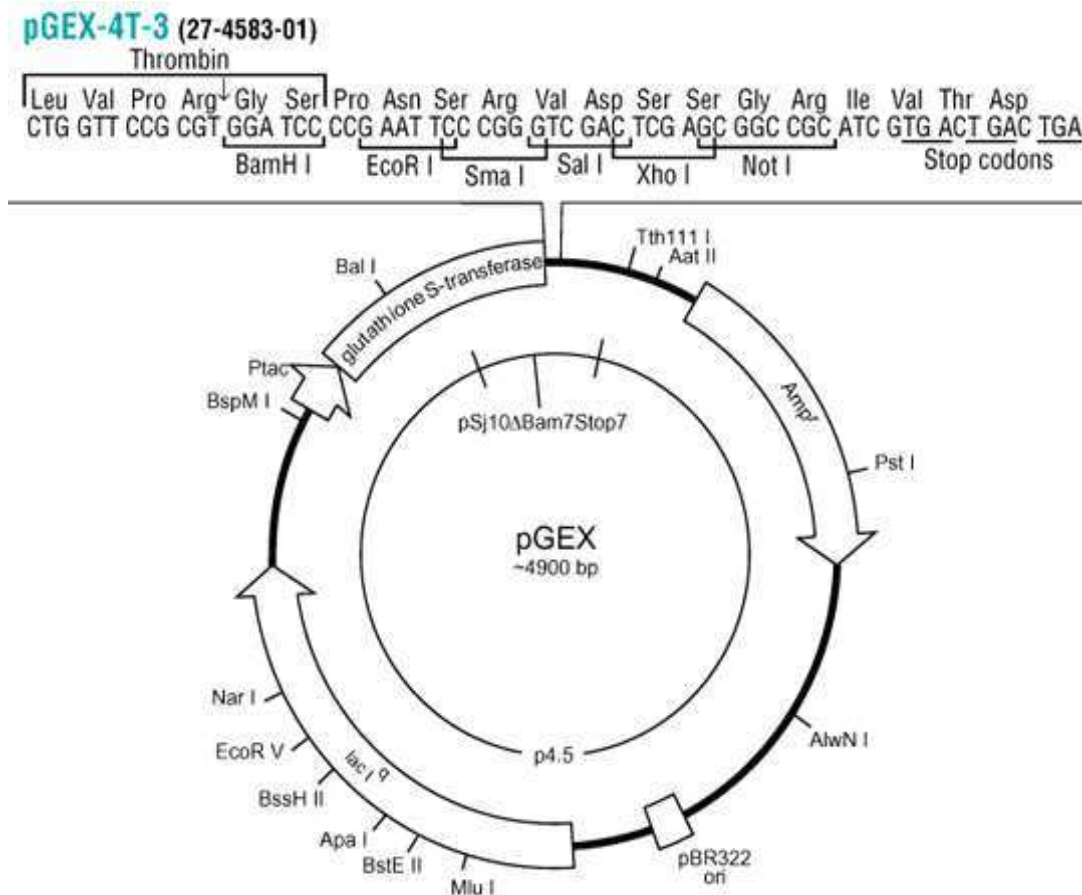


**Figura M.2:** Mapa del vector pGL3(Basic)-Luc

### XII.c. Vector pGEX-4T-3

Este vector contiene la enzima GST (*glutathion S-transferase*) que será fusionada río abajo de la proteína a clonar. Nuevamente es este caso hay que tomar los recaudos necesarios para mantener el marco de lectura. Este vector es mayormente utilizado para generar y purificar proteínas de interés, debido a su sistema de fusión con las GST. Esa enzima puede ser retenida a través de una columna de afinidad (con glutation reducido, GSH), y luego eluída; eliminando de esta manera cualquier otra proteína que no sea de interés.

En este vector clonamos el péptido que va del aminoácido 30 al 116 de MageB2 por diferenciarlo de cualquier otro MAGE, para su posterior purificación y generación de anticuerpos anti-MageB2 (ver sección generación de anticuerpos). El *primer forward* contiene la secuencia de corte reconocida por BamHI, mientras que el *primer reverse* la secuencia para el reconocimiento de XhoI.

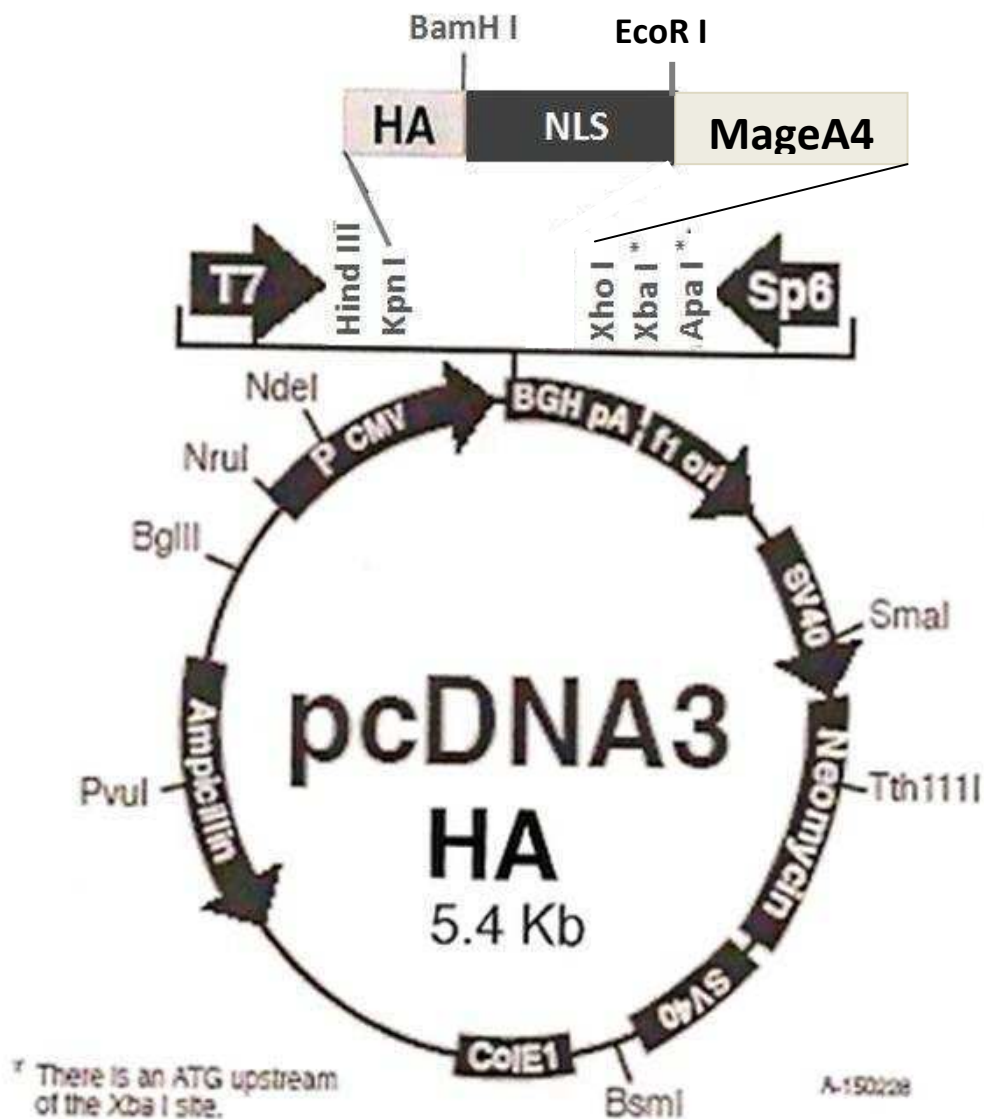


**Figura M.2:** Mapa del vector pGEX-4T-3. El sitio de clonados múltiples se describe secuencialmente arriba.

### XII.d. Vector pcDNA<sub>3</sub>-HA-MageA4

Este vector contiene al gen de expresión MageA4 etiquetado con el péptido HA que ríe abajo. En este caso simplemente adicionamos el oligonucléotido con la señal de localización nuclear (NLS). Teniendo en cuenta el marco de lectura se eligen las ER para la inserción del oligo NLS, previamente diseñado con las secuencias de reconocimiento de las ER elegidas en sus extremos.

Digerimos el vector pcDNA<sub>3</sub>-HA-MageA4 con BamHI y EcoRI para ligar el oligo NLS entre la secuencia HA y MageA4.



**Figura M.2:** Mapa del vector pGEX-4T-3. El sitio de clonados múltiples se describe arriba.

### **XIII. Transformación celular bacteriana**

#### **XIII.a. Preparación de bacterias ultracompetentes**

Tanto bacterias *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  como BL21 fueron tratadas químicamente para su posterior transformación. Para ello, se pica una única colonia de la cepa bacteriana correspondiente, obtenida a partir de un cultivo a 37°C previamente sembrado con anza en medio LB agar (0,5% Extracto de levadura, 1% Triptona, 0,5% NaCl, 1,2% agar). Esa colonia es incubada en 25 ml de medio líquido SOB (2% triptona, 0,5% extracto de levadura, NaCl 8,6 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM) a 37 °C en agitación por 6 horas. Luego se diluye el inóculo bacteriano 1:50 en 250 ml finales de medio LB (0,5% Extracto de levadura, 1% Triptona, 0,5% NaCl) y se incuba a 22°C en agitación hasta que la densidad óptica a 600nm alcance un valor de 0,55. El cultivo bacteriano se enfría en hielo durante 10 minutos y se centrifuga a 4.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. El pellet obtenido se resuspende en 80 ml de solución de transformación fría (MnCl<sub>2</sub> 55 mM, CaCl<sub>2</sub> 55 mM, KCl 250 mM, PIPES 10 mM pH 6,7) y se centrifuga otros 10 minutos a 4.000 rpm a 4 °C. Luego el pellet se resuspende en 20 ml de solución de transformación fría, al que se adicionaron 1,5 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) y se deja enfriar nuevamente en hielo por 10 minutos. Finalmente se fracciona, se congela rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenan esas alícuotas a -80 °C hasta el momento de su utilización.

#### **XIII.b. Transformación Química de bacterias ultracompetentes**

Se toman 100  $\mu$ l de bacterias ultracompetentes para ser transformadas con todo el volumen de la reacción de ligación o con 30 ng de vector circularizado, según correspondiera. Luego de incubar 20 minutos en hielo, se realiza un *shock* térmico incubando las bacterias a 42°C durante 90 segundos e inmediatamente se trasbasa a hielo y se incuba por 5 minutos. Posteriormente se agregan 500  $\mu$ l de medio SOC (2% triptona, 0,5% extracto de levadura, NaCl 8,6 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, glucosa 20 mM) y se incuba a 37 °C en agitación durante 1 hora con el objeto de permitir la recuperación de las bacterias de la situación de estrés a la cual fueron sometidas. Terminada la incubación se centrifuga a 5000 rpm por 60 segundos, se descartan 500  $\mu$ l sobrenadante y con el remanente se resuspende el pellet de bacterias y se siembra en la placa previamente plaqueada con medio LB agar en presencia del antibiótico (ampicilina o kanamicina) que correspondiera de manera de seleccionar las bacterias transformadas con el vector clonado. Finalmente, se incuba durante toda la noche a 37°C.

### **XIII.c. Selección de los clones positivos**

Debido a que siempre existe la posibilidad de tener vector religado es necesario evaluar un número adecuado de colonias por cada placa para comparar con el control negativo y luego verificar si efectivamente tienen el inserto. Para ello, en el caso que aproximadamente hubiera 3 veces más de colonias positivas que en la placa de control negativo, realizamos reacciones de *colony PCR* utilizando los *primers* correspondientes al inserto clonado. Esta técnica nos permite detectar amplificaciones de los clonados positivos, de muchas colonias a la vez y sin la necesidad de un paso previo de purificación de ADN. En esterilidad se pican las colonias con una punta de plástico estéril, se introduce en el tubo de la reacción de PCR, se agita brevemente y luego se reserva en un tubo cónico con 1 ml de medio LB estéril. Se analizan los productos de la PCR mediante la visualización de las bandas en un gel 1,5 % de agarosa con BrEt, y se cultivan los clones cuyos productos de PCR fueron positivos para la visualización de la banda esperada.

Se realiza, entonces, la extracción de ADN plasmídico a baja escala de cada cultivo realizado a partir de cada colonia positiva para el vector clonado, y evaluamos una vez más el correcto clonado mediante reacciones de digestión, ya sea para visualizar la liberación del inserto o sencillamente la pérdida de algunas secuencia reconocida por las ER.

Para confirmar la identidad de la secuencia clonada, se realizó la secuenciación automática del ADN plasmídico de alguno de los clones bacterianos positivos, utilizando los *primers* universales de cada vector en particular.

### **XIII.d. Stock de Glicerol**

Con las colonias positivas y secuenciadas se realiza un stock de glicerol para conservar las bacterias por largos períodos. Para esto se toman 500 µl de las bacterias frescas crecidas de la noche anterior y se les agrega 500 µl de Glicerol 60% estéril. Y se guarda la mezcla a -70°C hasta el momento de usar.

## **XIV. Preparación de ADN plasmídico a mediana escala (Midiprep): Wizard Plus Midipreps, ADN Purification System (Promega)**

Se repican unos 20 µl del stock de glicerol de la bacterias transformadas con el plásmido deseado y se crecen en 100 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente, incubando a 37 °C en agitación durante la noche. Al día siguiente se centrifuga todo el volumen 10 minutos a 6.000 rpm. Se descarta el sobrenadante y el pellet bacteriano obtenido se resuspende en 3 ml de *buffer* de

resuspensión (P1), vortéjando y pipeteando vigorosamente hasta obtener una solución homogénea. Se agregan 3 ml de *buffer* de lisis (P2), se mezcla suavemente por inversión y se deja actuar por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregan 3 ml de *buffer* de neutralización (P3) y se mezcla suavemente por inversión. Se deja actuar 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga a 10.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Se transvasa el sobrenadante a un tubo limpio y se agregan 10 ml de resina que une al ADN, mezclando suavemente por pipeteo y se trasvasa a la columna provista por el kit. Esta columna tiene un filtro en el cual se retiene la resina unida al ADN, mediante una bomba de vacío se elimina el líquido; se lava dos veces con 15 ml de solución de lavado. Y se procede a la elución del ADN, primero se centrifuga la columna a máxima velocidad por un minuto para eliminar el exceso de líquido remanente y finalmente se eluye el ADN plasmídico con 300 µl de agua milli-Q precalentada a 60°C centrifugando un minuto. Se cuantifica el ADN mediante nanodrop y, se corre en un gel de agarosa al 1% en *Buffer* TAE 1x por 20min a 60V (esto permite chequear tanto la correcta purificación del plásmido como la integridad del mismo). Se guarda a -20 °C hasta su utilización.

## **XV. Generación de anticuerpos**

### ➤ Producción de la proteína recombinante GST-MageB2 (30-116)

El cultivo de bacterias *E. coli* de la cepa BL21 transformadas con el vector pGEX-MageB2(30-116) crecidas en 50 ml de medio LB con ampicilina a 37 °C durante la noche anterior, se transvasa a un volumen aproximado de 10 veces mayor de LB ampicilina (el volumen final de cultivo será de 500 ml), y se incuba en agitación a 37°C hasta que alcance una densidad óptica de entre 0,7 y 0,9 a una Abs<sub>600</sub>. En ese momento se induce la producción de proteína GST-MageB2 con el agregado de 2 mM de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) al medio y se lleva el cultivo a incubar a 30°C durante 4 horas en agitación. Pasado el tiempo de inducción, se centrifuga el cultivo bacteriano a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C y se resuspende el pellet bacteriano en 1 ml de *buffer* de lisis (NP-40 1%, EDTA 5 mM; en *buffer* fosfato salino, PBS) y se deja en agitación a 4°C por 30 minutos. Para romper las células se sonica todo el volumen intercalando 5 ciclos de 30 segundos de sonicación (*Fisher Sonic dismembrator Model 300*, intensidad media) y 30 segundos de reposo en hielo. Luego de centrifugar a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C se obtiene el sobrenadante proteico, al cual una vez trasvasado se le agrega el mismo volumen de resina agarosa-glutation (número de catálogo G-2879, Molecular probes) y se agita por 4 horas a 4 °C, en este paso se favorece la adsorción de la proteína recombinante a la resina.

Concluída la incubación se elimina el líquido remanente por centrifugación (13.000 rpm por 5 minutos) y se lava la resina con *buffer* de lavado (Hepes 10 mM pH 7,4, NaCl 1M; en agua). Luego, se realizan 3 lavados de 10 minutos a 4 °C con *buffer* HKE (Hepes 10 mM pH7,4, KCl 25 mM, EDTA 1 mM), eliminando el excedente por centrifugación (13.000 rpm por 5 minutos). La elución de GST-MageB2 (30-116) se realiza 3 veces incubando en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente con 500 µl de glutation reducido (GSH 10 mM en Tris-HCl 50 mM pH 8; en agua), el glutation compite con la resina por la enzima GST, liberando la proteína fusionada al sobrenadante. De esta manera mediante la centrifugación a 13.000 rpm durante 5 minutos se logra purificar la proteína en cuestión. Las 3 eluciones se recolectaron juntas, se cuantificaron y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

➤ Detección de la proteína GST-MageB2 (30-116) mediante la tinción con el colorante azul de Coomassie

Se corrieron las muestras proteicas GST (como control) y GST-MageB2 (30-116) en SDS-Page. Los geles se incubaron con una solución de azul de *Coomassie* 0,05% (*Coomassie Brilliant Blue R 250* 0,05%, metanol 50%, ácido acético 10%) por 20 minutos con agitación suave. Se retira la solución de tinción y se elimina el exceso de colorante mediante sucesivas incubaciones con la solución decolorante (metanol 12%, ácido acético 7%), hasta visualizar la aparición de las bandas nítidamente.

➤ Cuantificación de la proteína

La cuantificación de las eluciones proteicas (sección 2) se realiza mediante el método colorimétrico de *Bradford*, en el que se utiliza al colorante azul de *Coomassie* que, al interaccionar con las proteínas (preferencialmente con los grupos funcionales básicos de las proteínas), cambia su espectro de absorción.

La curva de calibración empleada comprende masas entre 0,25 y 5 µg de Seroalbúmina Bovina (BSA). Cada medición se realiza por triplicado en un volumen final de 200 µl (100 µl de reactivo de *Bradford* y 100 µl de proteínas en agua). Se tomaron 3 volúmenes diferentes de la proteína purificada. Luego de 15 minutos de agregado el reactivo de *Bradford* se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro. Se graficaron los valores de la curva de calibración y se ajustó a una recta. Con la ecuación de la recta se calculó la concentración proteica.

➤ Producción de suero de conejo contra GST-MageB2 (30-116)

El protocolo experimental adoptado para la producción del suero de conejo fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA.

Se prepararon *boosters* de 1 ml. El primero con 500 µg de GST-MAGEB2 (30-116) en PBS estéril (hasta alcanzar un volumen de 500 µl) formulados en 500 µl de adyuvante completo de *Freund*. Los siguientes con 300 µg de GST-MAGEB2 (30-116) en PBS estéril formulados en 500 µl de adyuvante incompleto de *Freund*.

Se utilizó una coneja de Nueva Zelanda blanca de 3 meses de edad que fue inoculada por vía subcutánea, aplicándose dosis de refuerzo a intervalos de 21 días. Antes de la primera inoculación y a los 15 días de cada inoculación se tomó una alícuota de sangre de la oreja con el fin de evaluar el avance de la inmunización. Cuando se consideró oportuno, el animal fue sangrado, se obtuvo el suero por centrifugación de la sangre durante 1 minuto a 13.000 rpm y éste fue conservado a -20°C hasta su utilización.

➤ Purificación anticuerpos contra GST-MAGEB2 (30-116) del suero de conejo

Se generó una resina de agarosa-glutation con la proteína GST-MAGEB2 (30-116) unida covalentemente mediante un tratamiento químico. En primera instancia, se realizó el procedimiento de producción de proteína recombinante descrito en la sección 2 hasta los lavados con *buffer* HKE. En este punto, se realizaron lavados con borato de sodio (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 0,2 M pH 8,8) centrifugando a 5.000 rpm por 3 minutos entre cada uno. Dichos lavados son necesarios para estabilizar la resina en un pH adecuado (alcalino) para el posterior tratamiento con dimetil pimelidato·2HCl (DMP, 5 mg/ml en trietanolamina 0,2 M pH 8,3), un compuesto que contiene grupos imidoester que reaccionan con aminas primarias generando enlaces covalentes (grupos amidina).

Se usó una relación 2:1 de DMP:resina y se agitó por 45 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó para eliminar el sobrenadante y se agregó etanolamina (0,2 M pH 8,2) en exceso en dos lavados de 5 y 90 minutos, respectivamente; dos lavados cortos con glicina-HCl (0,1 M pH 2,5); y 4 lavados cortos con TBS. Tanto los lavados con etanolamina como con glicina-HCl detienen la reacción de *crosslinking*. Por último, se agregaron 100 µl de TBS-AzidaNa 0,02% y se guardó la resina a 4 °C hasta su utilización.



Mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (sección 3.1) se corroboró la eficiencia del tratamiento con DMP.

Para la purificación de anticuerpos GST-MAGEB2 (30-116), el suero fue diluído al medio en TBS e incubado 1 hora a 4 °C con la resina agarosa-glutation-GST-MAGEB2 (30-116). Luego, se realizaron 2 lavados de 5 y 30 minutos con exceso de TBS-Tween (0,1%), centrifugando a 5.000 rpm por 3 minutos entre cada uno.

Las eluciones se realizaron con 1 ml y 500 µl de glicina-HCl (0,1 M pH 2,5), incubando 5 minutos a 4 °C con agitación ocasional y centrifugando entre cada una. Inmediatamente, cada elución de anticuerpo GST-MAGEB2 (30-116) fue llevada a pH neutro por el agregado de Tris-base 2 M pH 9, y almacenada a -20 °C hasta su utilización.

➤ Análisis del suero de conejo contra GST-MAGEB2 (30-116): Western blot para detección de anticuerpos dirigidos contra GST-MAGEB2 (30-116)

Las sangrías del conejo a los 14 días de cada inoculación, junto con el suero preinmune (antes de la primera inoculación) se usaron 1:1000 en solución de bloqueo. El suero GST-MAGEB2 (30-116) sin purificar y purificado se usaron a diferentes diluciones (1:1000, 1:1500 y 1:2000) y usando una solución de TBS-T-leche (5%). También se ensayaron distintas concentraciones de NaCl (componente del TBS), para diluir el suero GST-MAGEB2 (30-116), y se probó bloquear la membrana de nitrocelulosa con la solución de TBS-Tween (0,1%)-leche descremada (5%).

## **XVI. Descarte del material biológico y residuos peligrosos**

El material que estuvo en contacto con el colorante de Hoechst y los geles conteniendo bromuro de etidio fueron inactivados bajo luz UV durante 1 h y, posteriormente, descartados como residuos peligrosos a través del Servicio de Higiene y Seguridad de la F.C.E.yN.

Las células fueron descontaminadas mediante el agregado de hipoclorito de sodio 5% durante toda la noche.

El material de descarte (plástico, guantes, geles de poliacrilamida) fueron eliminados como residuos peligrosos a través del Servicio de Higiene y Seguridad de la F.C.E.yN. De la misma forma fueron descartadas las soluciones de DAF, Folin y las soluciones conteniendo solventes como metanol, ácido acético, etc.

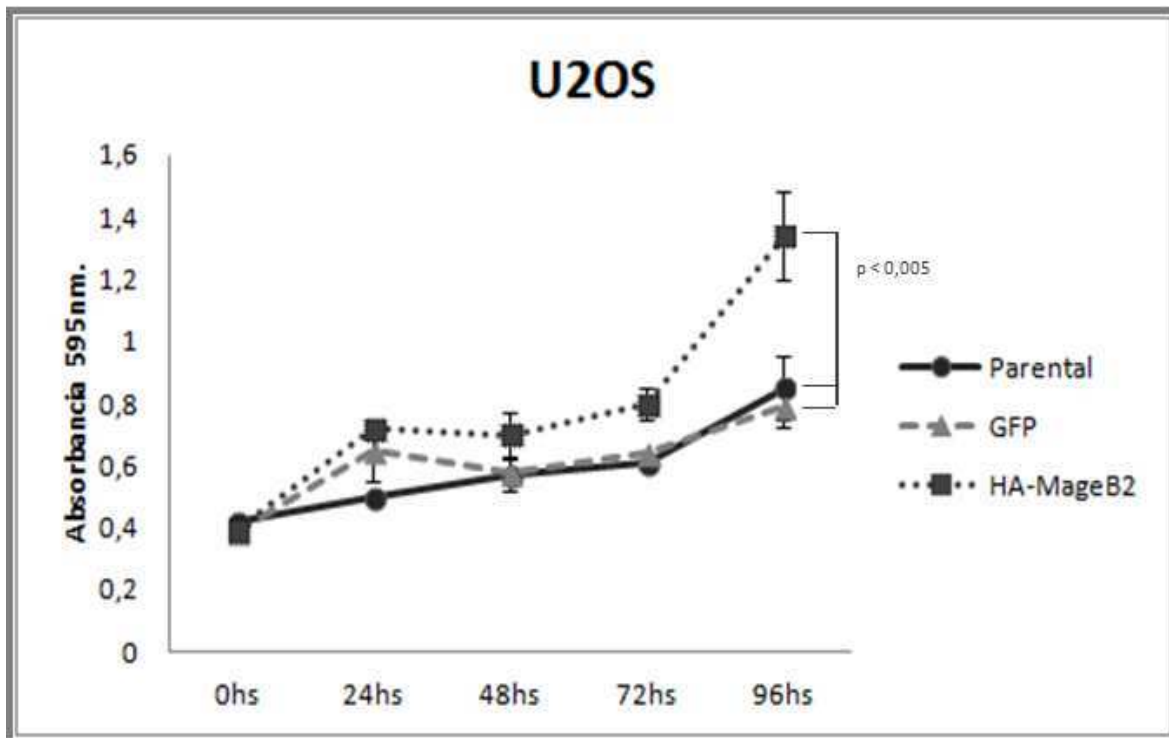
# Resultados

# Parte 1: Caracterización de MageB2 humano

## **1. MageB2 induce la Proliferación celular de manera independiente del estado de p53**

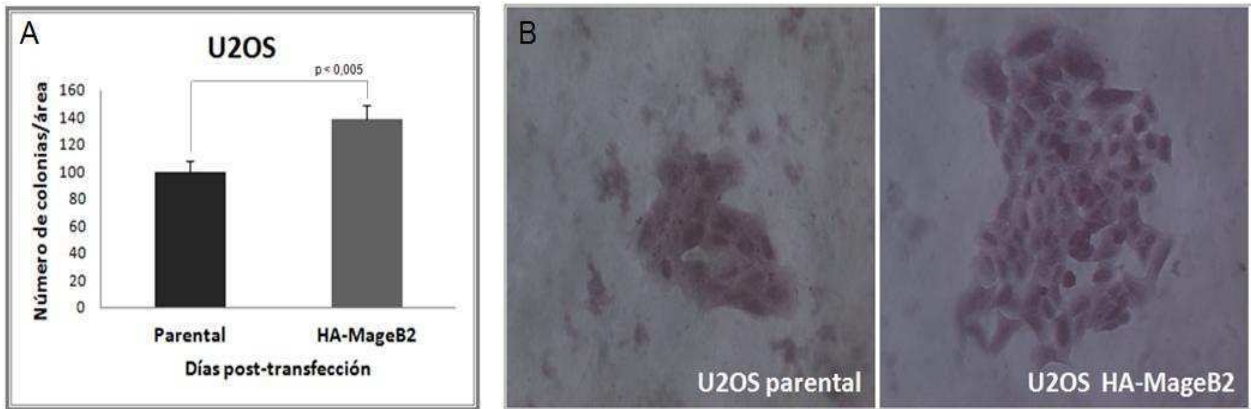
Basados en nuestros resultados previos (ver sección I-2.1.2) sobre el efecto pro-proliferativo de HA-MageB2 tanto en fibroblastos humanos normales Wi38 como en los tumores crecidos en ratón a partir de las células B16 GFP-MageB2, nos propusimos corroborar la función pro-proliferativa de MageB2 en otro modelo con líneas celulares tumorales humanas. Para ello generamos líneas U2OS estables que sobre-expresaran la proteína HA-MageB2 o la proteína GFP como control. De esta manera transducimos las células con los vectores lentivirales que expresan a HA-MageB2 o GFP. Una vez obtenidas las líneas estables realizamos ensayos de Western Blot (WB) e inmunofluorescencia (IF) para corroborar la expresión y el porcentaje de células que expresan la proteína de interés, respectivamente. Una vez confirmada la calidad de las líneas obtenidas, realizamos los ensayos de proliferación celular.

Mediante la técnica colorimétrica de cristal violeta realizamos el seguimiento de la cinética de crecimiento de las líneas U2OS estables (HA-MageB2 y GFP) y de la línea U2OS parental como un segundo control. Básicamente esta técnica consiste en la tinción de las células con cristal violeta, lavado y remoción del volumen coloreado para leer la absorbancia a longitud de onda de 595 nm en espectrofotómetro. Los resultados de 3 experimentos independientes confirman que la sobre-expresión de MageB2 confiere ventajas pro-proliferativa (Figura 1).



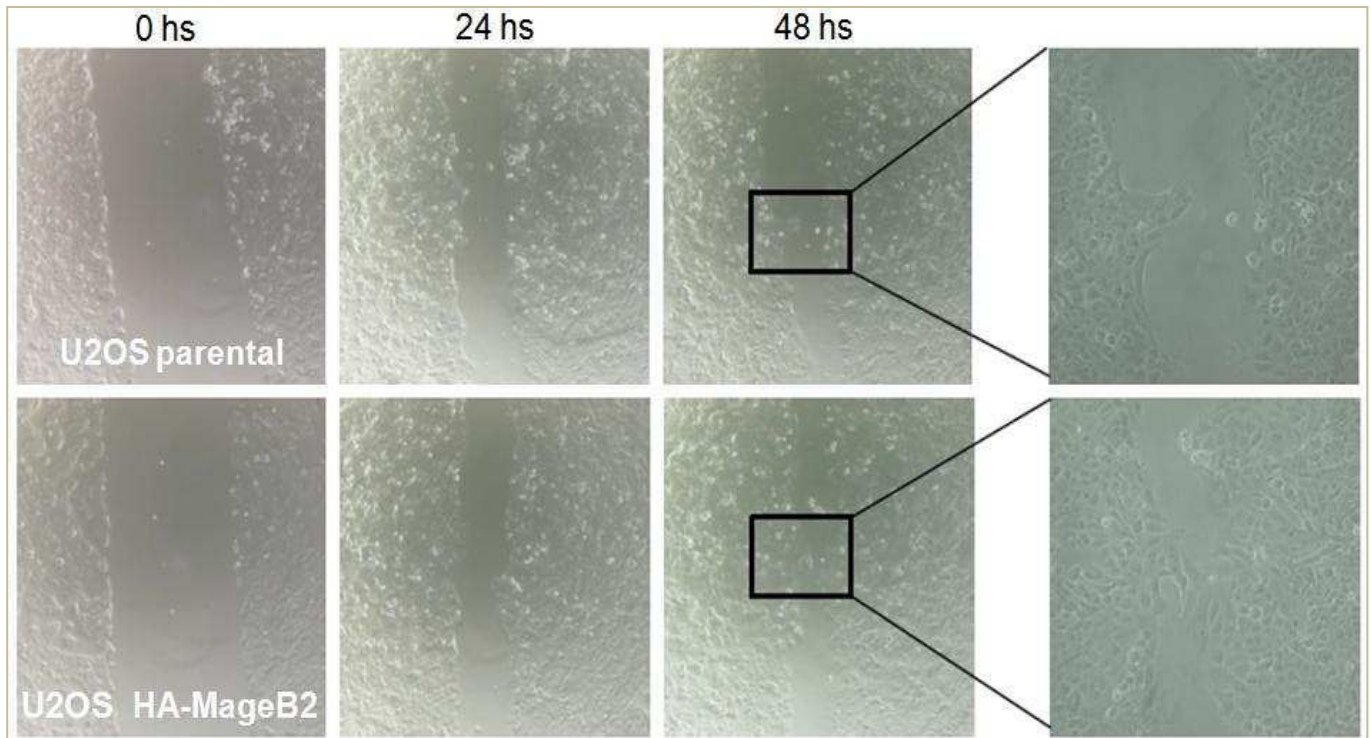
**Figura 1:** Cinética de crecimiento a distintos tiempos de las líneas celulares U2OS parental, U2OS GFP y U2OS HA-MageB2 por medición de la Absorbancia a 595 nm. de la tinción con Cristal Violeta a distintos tiempos de incubación 0-24-48-74 y 96 hs. Las barras de error indican el D.E.; se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa.

Ya que no se observa una diferencia significativa entre las líneas control U2OS parental y la línea que expresa GFP, utilizamos la línea U2OS parental para realizar el ensayo de crecimiento independiente de sustrato. Vale destacar que este tipo de ensayo se utiliza para comparar células transformadas de no transformadas. En nuestro caso, tratándose en ambos casos de células tumorales, solo pudimos distinguir diferencias entre la línea parental U2OS y la línea estable U2OS HA-MageB2 en términos de tamaño de clones debido seguramente a la elevada proliferación celular que ya habíamos determinado en el punto anterior. En el gráfico 2.A se muestra la cuantificación de colonias generadas en ambos casos y en la figura 2.B se observa la cantidad de células que forman esas colonias. Observamos que la expresión de MageB2 correlaciona con el incremento del número de colonias visibles y con la generación de colonias de mayor tamaño.



**Figura 2:** Ensayo de crecimiento independiente de sustrato. Recuento del número de colonias formadas (A). Fotomicrografía de una colonia generada en por las células U2OS parentales o por las células con sobreexpresión de HA-MageB2 (B). Las barras de error indican el D.E.; se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa.

Luego, con éstas mismas líneas realizamos ensayos de cicatrización de herida para evaluar si había ventajas conferidas en la migración celular por parte de MageB2. Para ello se realizó una pequeña incisión con una punta de plástico estéril sobre la monocapa celular en las líneas U2OS parental y U2OS HA-MageB2 para comparar el tiempo en que esa herida tarda en cerrarse. Se tomaron fotos al tiempo 0, 24 y 48 horas de haber realizado la herida. Se observa que la línea U2OS HA-MageB2 a las 48hs. muestra un menor tamaño de herida a lo largo de la placa comparado a su control, y además se observan sectores con esa herida prácticamente cerrada (Figura 3). Esos datos sugieren que las células que sobreexpresan MageB2 son capaces de cerrar la herida más rápido que su control parental, pero no se podría sugerir que tenga un efecto en la migración celular ya que a las 24hs no se observaban células migrando dentro de la herida, por lo que indica que su efecto estaría asociado a una mayor proliferación pero no a migración.

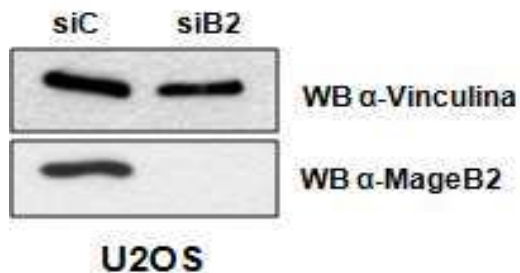


**Figura 3:** Fotomicrografía a 0, 24 y 48 hs. del ensayo de cicatrización de herida en las líneas U2OS parental y

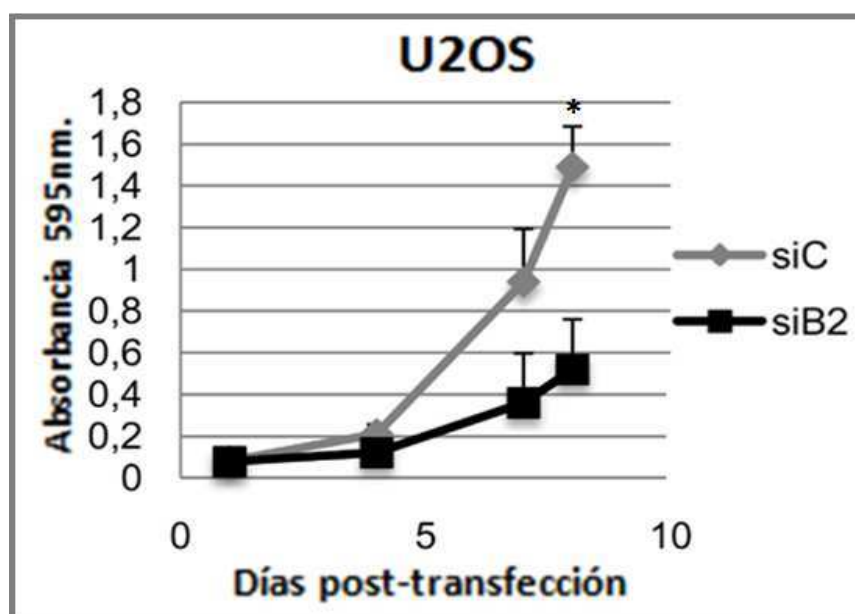
U2OS HA-MageB2.

Seguidamente con el fin de evaluar el efecto de MageB2 endógeno en la proliferación celular, realizamos ensayos utilizando células U2OS transfectadas con un *siRNA* (ARN de interferencia) específico para silenciar el gen *mageB2* (*siB2*) y el control *siRNA*-luciferasa (*siC*). La eficiencia en el silenciamiento de la expresión de la proteína MageB2 se verificó mediante Western Blot utilizando un anticuerpo anti-MageB2 generado en nuestro laboratorio (ver sección MyM-XV.). Se observó una potente regulación negativa de la expresión de MageB2 por este *siB2* (Figura 4).

De la misma manera previamente descrita estudiamos la cinética de la proliferación celular a través de la técnica de cristal violeta durante 8 días post-transfección del *siB2* o *siC* en la línea U2OS. Los resultados obtenidos indican una regulación negativa de la cinética del crecimiento celular al regular negativamente a MageB2 en esta línea celular (Figura 5). Estos datos están en consonancia con los previamente obtenidos por sobre-expresión de MageB2 humano.



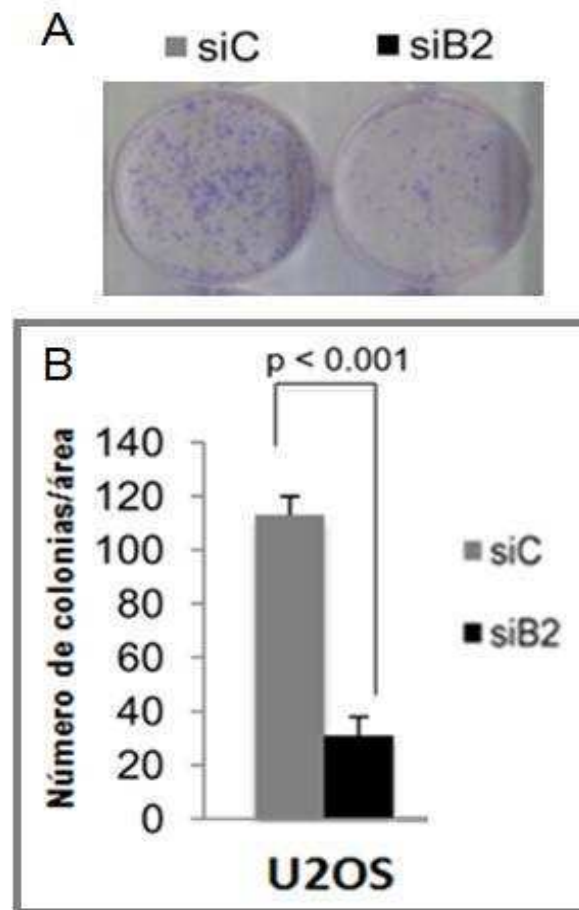
**Figura 4:** Western Blot de las células U2OS transfectadas con un siRNA específico contra MageB2 (siB2) o un siRNA inespecífico como control (siC). Se revela la proteína MageB2 y vinculina como control de carga.



**Figura 5:** Medición de la cinética de crecimiento celular de las células U2OS mediante la tinción de cristal violeta y absorbancia a  $A_{595}$ . Se midieron las muestras al día 1, 4, 7 y 8 post-transfección del siRNA contra MageB2 (siB2) o control (siC). Las barras de error indican el D.E.; \* indica  $p < 0,01$ . Se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa.

Paralelamente realizamos otro tipo de ensayo de proliferación celular mediante la técnica de formación de colonias. En este caso, el abordaje experimental consta del sembrado de un número reducido de células pre-tratadas con los siRNAs correspondientes al siC o siB2. Una vez que se observan colonias formadas, se tiñen las placas con cristal violeta y se cuantifican por área. Nuestros resultados indican una significativa disminución

del número de colonias generadas por el *knock down* (KD) de MageB2 endógeno (siB2) en comparación con su control (siC) (Figura 6).



**Figura 6:** Formación de colonias de las células U2OS en presencia (siC) o ausencia (siB2) de MageB2 endógeno silenciando mediante siRNA. Fotografía de las colonias en placa (A). Cuantificación de las colonias observadas por aérea de medición (B). Las barras de error indican el D.E.; se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa.

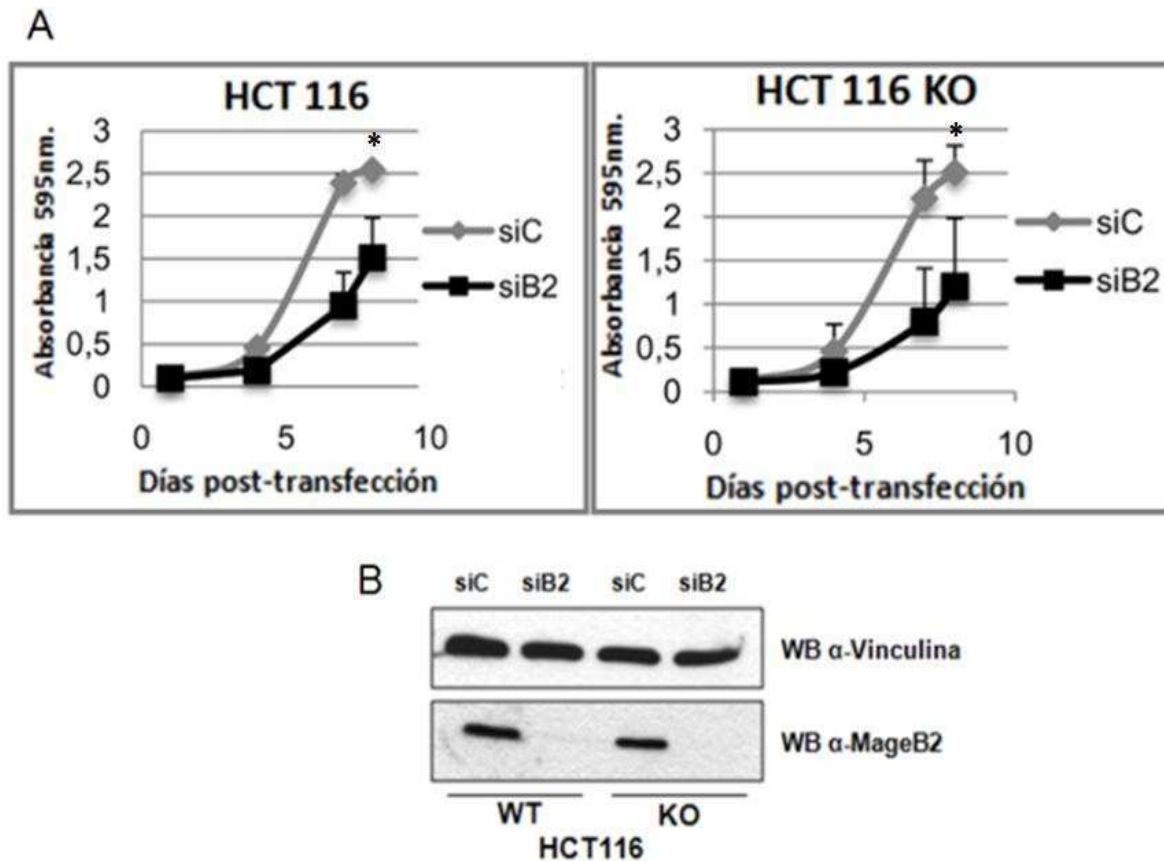
Como mencionamos en la introducción, nuestros estudios demostraron la estrecha relación que existe entre MageA2 y el factor p53 para conferir a las células tumorales resistencia a la apoptosis (Monte, Simonatto et al. 2006). Debido a que MageB2 y MageA2 pertenecen a la misma familia y demuestran significativa homología de secuencia y que además ambos subgrupos proteicos se expresan tempranamente en la carcinogénesis



(Jang, Soria et al. 2001) nos propusimos verificar si al igual que MageA2, MageB2 ejerce su ventaja pro-proliferativa a través de la regulación del supresor tumoral p53. Otros indicios que contribuyen a postular una asociación entre MageB2 y p53 son los reportes que indican que los genes *mage-b* murinos confieren una ventaja pro-proliferativa y una protección anti-apoptótica dependiente de p53 (Yang, O'Herrin et al. 2007). Recientemente fue demostrado que el silenciamiento de Mageb18 murino regula positivamente la apoptosis celular como también el incremento de los niveles proteico del supresor tumoral p53 (Lin, Wen et al. 2012). En conjunto estos datos y teniendo en cuenta que MageB2 humano presenta un 50% de identidad proteica con los Mage-b murinos (De Backer, Verheyden et al. 1995), es lógico pensar en la existencia de un mecanismo similar por parte de MageB2 para conferir ventajas pro-proliferativas de forma dependiente de p53.

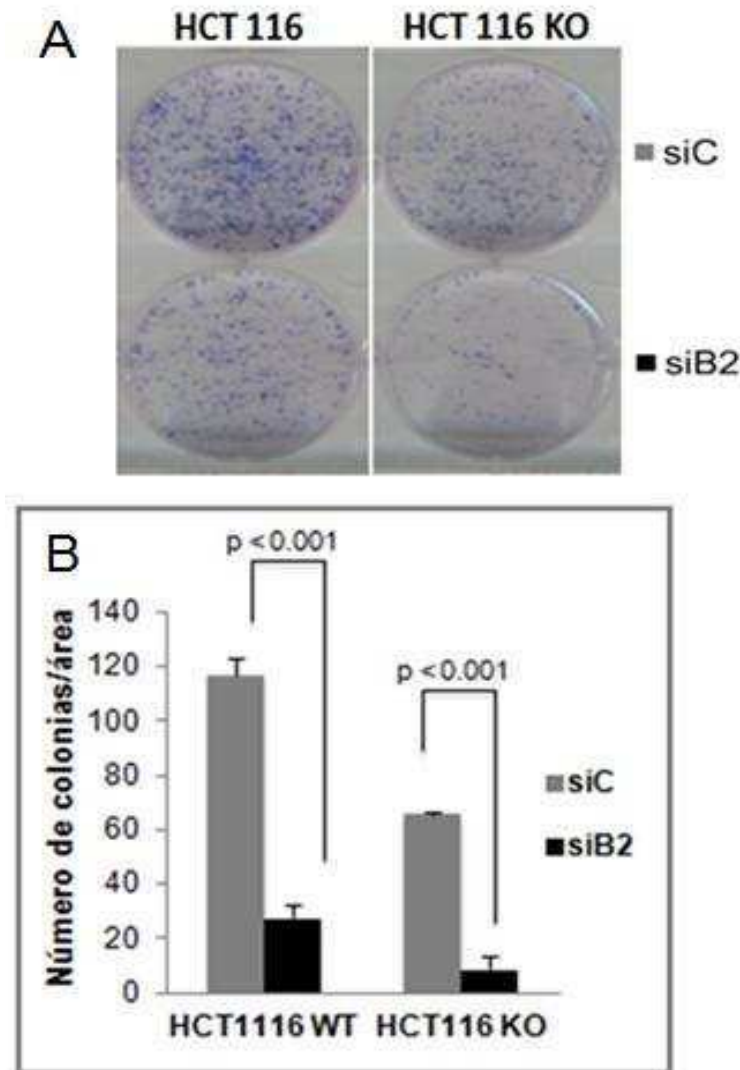
Con este fin decidimos utilizar un sistema de líneas celulares que nos permitiera evaluar el rol del factor p53 en la función de MageB2. Para ello utilizamos las líneas celulares de carcinoma de colón humano HCT116 wt y HCT116 p53<sup>-/-</sup> (HCT116 KO). Esta última línea posee la ablación del gen p53 y fue generada por recombinación homóloga en cultivo celular (Bunz, Dutriaux et al. 1998). En forma similar a lo realizado anteriormente con las células U2OS, silenciamos MageB2 en ambas líneas celulares HCT116 con siRNA-MageB2 (siB2) y el control siRNA-luciferasa (siC) y repetimos la cinética de crecimiento por tinción con cristal violeta.

En la figura 7.A se muestra el gráfico de la determinación de la proliferación celular durante 8 días luego del silenciamiento de MageB2. El resultado indica que el silenciamiento de MageB2 afecta similarmente el crecimiento en ambas líneas celulares, HCT116 wt y p53 KO. Esto sugiere que MageB2 regula la proliferación celular en forma independiente de p53. En la figura 7.B se muestran los niveles proteicos (técnica de Western Blot) de MageB2 correspondiente al silenciamiento de MageB2 por 48hs.



**Figura 7:** Medición de la cinética del crecimiento celular de las células HCT116 wt y p53 KO mediante la tinción de cristal violeta y absorbancia a DO 595 nm. Se midieron muestras al día 1, 4, 7 y 8 post-transfección del siRNA MageB2 (siB2) (A). Western Blot de las células HCT116 wt y p53 KO transfectadas con siRNA contra MageB2 (siB2) o un siRNA inespecífico como control (siC). Se revela la proteína MageB2 y vinculina como control de carga (B). Las barras de error indican el D.E., \* indica  $p < 0,01$ . Se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa.

Seguidamente, utilizando ambas líneas HCT116, realizamos el estudio de formación de colonias en presencia (siC) o ausencia (siB2) de MageB2. El resultado indica que, en forma similar al ensayo anterior, una reducción del número de colonias cuando se regula negativamente a MageB2 (siB2), y esa diferencia de disminución se mantiene en las células HCT116 wt y HCT116 KO (Figura 8).



**Figura 8:** Formación de colonias en las distintas líneas celulares HCT116 wt y p53 KO, silenciando MageB2 endógeno con siRNA (siB2) o utilizando un siRNA inespecífico como control (siC). Fotografía de las colonias en placa (A). Cuantificación de las colonias observadas por aérea de medición (B). Las barras de error indican el D.E.; se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa.

En conjunto estos resultados sugieren que los niveles de la proteína MageB2 (expresados en forma ectópica o endógenos) están directamente relacionados con la proliferación celular tanto en su cinética de crecimiento (Figura 5 y 7) como en el aumento del número de colonias observadas (Figura 6 y 8). Además, indican que este efecto proliferativo de MageB2 es independiente a p53, ya que no se encuentran diferencias

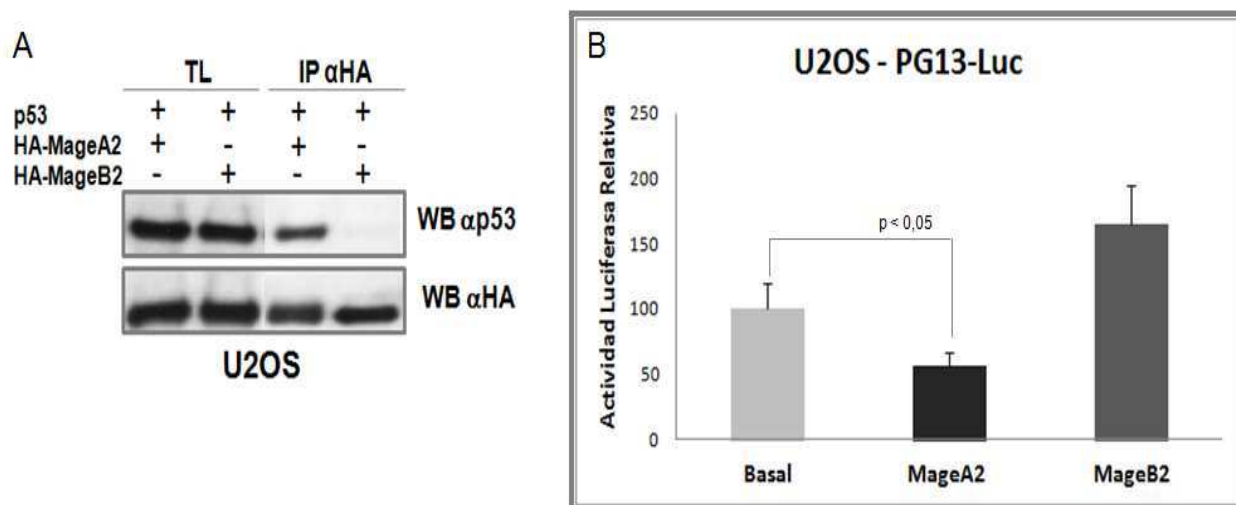
significativas entre los resultados obtenidos de las células tumorales con p53 funcional (wt) del de las células que no expresan este factor (figura 7 y 8).

Interesados en completar la comparación entre MageA2 y MageB2 con respecto a su relación con p53, nos propusimos verificar si existía asociación de MageB2 a p53 y también si poseía la capacidad de regular su actividad transcripcional, ya que MageA2 se une y en consecuencia reprime la actividad de p53 (Monte, Simonatto et al. 2006). Para estudiar esto realizamos un ensayo de inmunoprecipitación (IP) y analizamos la actividad transcripcional de p53 mediante ensayo de genes reporteros.

La inmunoprecipitación se realizó mediante la cotransfección de los vectores que codifican para p53 y HA-MageA2 o HA-MageB2 en células H1299 (p53 null). Luego de la inmunoprecipitación con anticuerpo  $\alpha$ -HA, se verificó la unión a p53 por Western Blot (Figura 9.A).

El ensayo de genes reporteros consistió en la transfección de células U2OS, que contienen al factor p53 wt y funcional, con el vector que expresa la proteína luciferasa Firefly río abajo de un promotor sintético PG13 que responde específicamente a p53 (PG13-Luc). Además se co-transfectó otro vector reportero con un promotor mínimo que expresa el gen de otra luciferasa (Renilla) para relativizar los valores de actividad p53. En distintos pocillos se transfectan por triplicado los vectores que expresan la proteína HA-MageA2 o HA-MageB2 o su control con un vector vacío para medir la actividad basal (Basal) (Figura 9.B).

Los resultados obtenidos de la inmunoprecipitación entre proteínas MageA2 o -B2 y el factor p53, indica que en las mismas condiciones donde sí se verifica unión entre MageA2 y p53, no se aprecia interacción entre MageB2 y p53 (Figura 9.A). Consistente con este resultado, observamos en los ensayos de genes reporteros que la sobre-expresión de MageB2 no disminuye la actividad transcripcional de p53 como lo hace MageA2, por el contrario, se observa una leve inducción (Figura 9.B). En conjunto estos datos indican que MageB2 a diferencia de MageA2 ejerce su efecto biológico en forma independientemente de p53.



**Figura 9:** Western Blot de la inmunoprecipitación de transfecciones de vectores que expresan HA-MageA2 o HA-MageB2, co-transfectados con p53 en células H1299 p53 *null* (A). Ensayo de genes reporteros: utilizando el vector pG13-Luc, promotor sintético que responde al factor p53. Relativizado a la actividad luciferasa Renilla con promotor constitutivo, co-transfectados con un vector vacío (Basal), HA-MageA2 (MageA2) o HA-MageB2 (MageB2) respectivamente. Las barras de error indican el D.E.; se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa (B).

## 2. La expresión de MageB2 estimula la actividad transcripcional del factor E2F

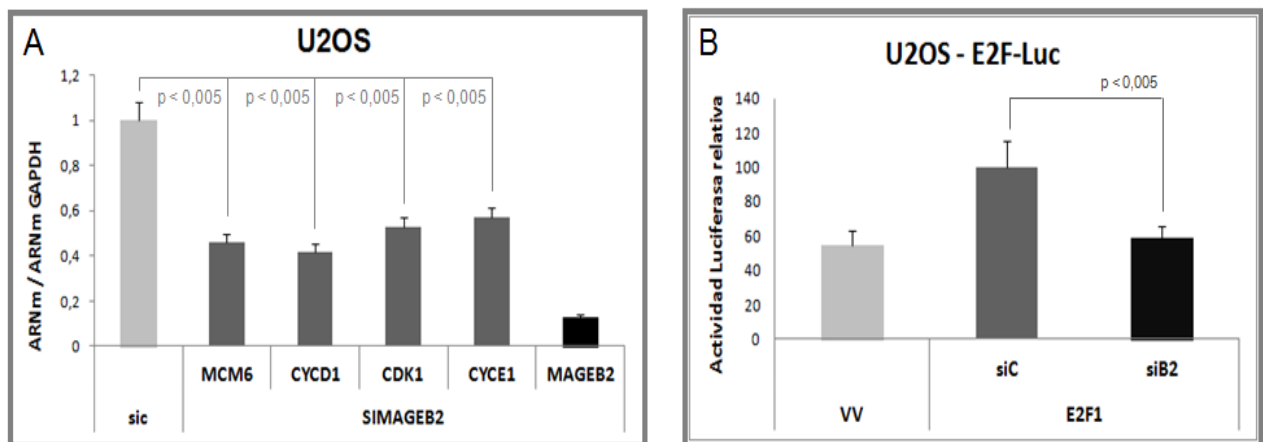
Luego de haber comprobado que la actividad proliferativa de MageB2 es independiente de p53 y por lo tanto difiere de la actividad anti-apoptótica reportada para MageA2, estudiamos otro factor clave en la proliferación celular como las proteínas E2F.

La vinculación entre MAGE y E2F fue previamente reportada para algunas proteínas pertenecientes a la subfamilia MAGE-II. Ha sido publicado que Necdina, una proteína de tipo MAGE-II y supresora del crecimiento neuronal, es capaz de interactuar e inhibir la actividad de E2F1 (Taniura, Taniguchi et al. 1998). La actividad de E2F también se observó regulada por otros dos MAGE-II como MageG1 (Kuwako, Taniura et al. 2004) y MageD1 (o NRAGE) (Salehi, Roux et al. 2000).

Para estudiar la relación entre la expresión de MageB2 y la actividad de E2F, analizamos la expresión de genes blanco de E2F asociados a la regulación del ciclo celular

en células U2OS silenciadas para la expresión de MageB2 (siB2). Se analizaron los niveles de ARN mensajero de varios genes blanco de E2F por RT-qPCR. Estos valores fueron relativizados al ARN mensajero de GAPDH y calculado por el método del ddCT. Los resultados obtenidos muestran una correlación entre el silenciamiento de MageB2 y la disminuída expresión de los genes analizados inducidos por E2F (Figura 10.A).

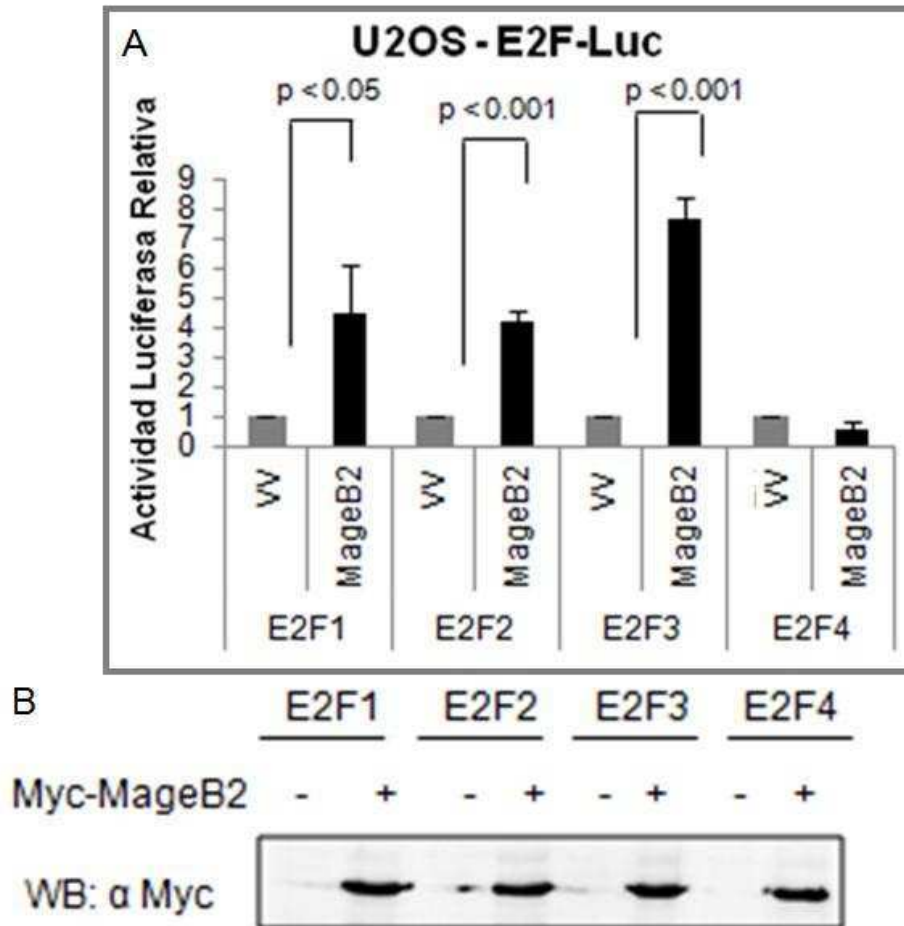
Seguidamente, para confirmar la especificidad de estos datos, realizamos un ensayo de genes reporteros, utilizando un promotor sintético que contiene seis secuencias consenso en *tandem* que responden a los factores de la familia E2F (6xE2F-Luc). Se transfectó entonces el factor E2F1 con los siRNA control (siC) o el siRNA contra MageB2 (siB2). Se observa que la regulación negativa de MageB2 causa una disminución de la actividad transcripcional de E2F1 sobre-expresado (Figura 10.B).



**Figura 10:** Cuantificación de ARNm mediante RT-qPCR de genes blanco de E2F1, relacionados a la regulación del ciclo celular, al silenciar MageB2 (siMageB2) en células U2OS. Los datos se encuentran relativizados al ARNm de GAPDH (A). Ensayo de genes reporteros en células U2OS utilizando el constructo 6xE2F-Luc. Se evalúa la actividad de E2F1 en sobreexpresión en presencia (siC) o ausencia (siB2) de MageB2 por silenciamiento con siRNA (B). Las barras de error indican el D.E.; se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa.

Nuestro siguiente paso fue analizar el efecto de MageB2 sobre la actividad transcripcional de distintos miembros de la familia E2F. Para ello utilizamos la construcción 6xE2F-Luc y los siguientes vectores que codifican para: HA-E2F1, HA-E2F2, HA-E2F3 y HA-E2F4, myc-MageB2, y el vector pcDNA3 vacío (VV) como control.

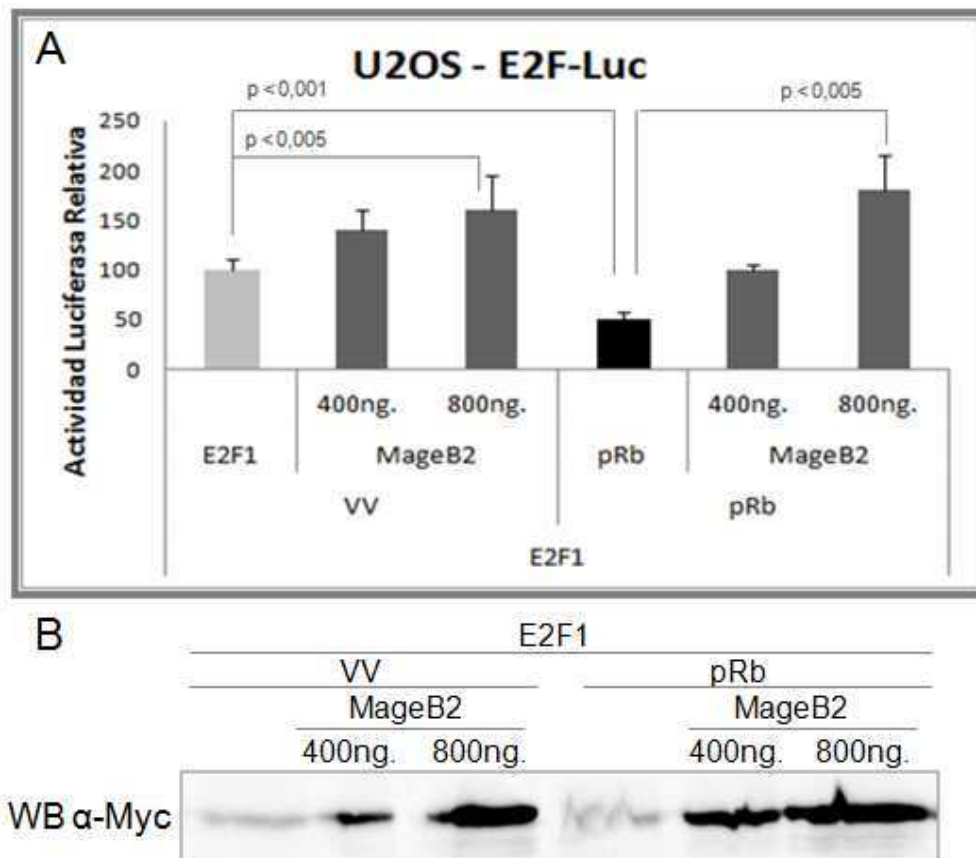
Como se muestra en la figura 11.A MageB2 induce la actividad transcripcional de todos los E2Fs testados, con la excepción de E2F4. Estos datos sugieren que MageB2 puede regular diferencialmente los miembros de la familia de E2F, siendo activador de los E2Fs activadores de la transcripción, mientras que no se observó un efecto significativo sobre el E2F4 cuya función es de represor transcripcional. La expresión de Myc-MageB2 se corrobora por Western Blot (Figura 11.B)



**Figura 11:** Ensayo de genes reporteros en células U2OS, utilizando 6x E2F-Luc. Se evalúa la actividad de E2F1,2,3 y 4 en presencia (MageB2) o ausencia (VV) de Myc-MageB2. Los valores están relativizados a la actividad luciferasa Renilla con promotor constitutivo (A). Western Blot de la expresión de Myc-MageB2 (B). Las barras de error indican el D.E.; se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas: p < 0,05 se considera estadísticamente significativa.

Como ya hemos explicado en la introducción, E2F1 es regulado por el supresor tumoral pRb. Siendo MageB2 capaz de inducir a E2F1, nos preguntamos si este efecto

activador de MageB2 sobre E2F1 observado tendría que ver con una regulación negativa de pRb por parte MageB2. De esta manera comenzamos a estudiar el mecanismo de acción de MageB2 sobre E2F1. Mediante el ensayo de genes reporteros utilizando nuevamente el vector E2F-Luc previamente descrito, se analizaron dos cantidades del vector Myc-MageB2 (MageB2) co-transfectadas con el vector E2F1 en presencia o ausencia del vector que expresa a la proteína pRb. En la figura 12.A se observa un incremento de la actividad transcripcional de E2F1 basal de manera dosis dependiente de MageB2. Además los resultados indican que MageB2 es capaz de revertir la represión que pRb ejerce sobre el factor E2F1 de manera dosis dependiente también. La expresión de Myc-MageB2 se corrobora por Western Blot (Figura 12.B)



**Figura 12:** Ensayo de genes reporteros en células U2OS, utilizando el vector 6x2F-Luc. Se evalúa la actividad de E2F1 co-transfectado de dos concentraciones del vector que expresa Myc-MageB2 (MageB2 400 y 800 ng. respectivamente) y además en ausencia (VV) o presencia de pRb. Los valores de cada muestra se encuentran relativizados a la actividad luciferasa Renilla con promotor constitutivo como control de transfección y a su vez relativizados a la actividad de E2F1 transfectado (A). Western Blot de la expresión de Myc-MageB2 (B). Las barras de error indican el D.E.; se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa.



Iniciamos la investigación sobre el mecanismo por el cual MageB2 podría inducir la actividad de E2F basándonos en dos hechos: i) las HDACs (desacetilasas de histonas) son enzimas muy importantes en la regulación de la actividad de E2F; ii) algunos miembros del grupo Mage-A tienen la capacidad de formar complejos con HDACs.

Estas premisas nos llevaron a preguntarnos si la activación observada de MageB2 sobre la actividad de E2F podría estar relacionada con las HDACs.

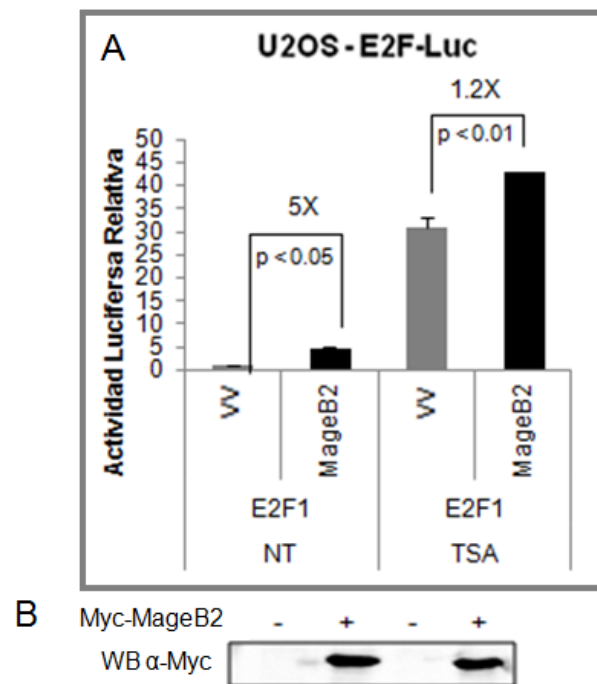
En la literatura se encuentra ampliamente estudiada la regulación de la actividad transcripcional de E2F a través de HDACs. Numerosos reportes indican que diferentes reguladores de E2F como pRb (Magnaghi-Jaulin, Groisman et al. 1998), Sin3B (Grandinetti and David 2008), Kap1 (Wang, Rauscher et al. 2007), Ebp1 (Zhang, Woodford et al. 2003) y Ell (Zhang, Ji et al. 2014) inhiben la actividad su actividad mediante el reclutamiento de HDACs.

Por otra parte, han sido reportadas interacciones entre MageA1 y HDAC1 y/o HDAC4 para regular la actividad de SKIP (Laduron, Deplus et al. 2004), mientras nosotros reportamos la interacción entre MageA2 y HDAC3 para regular la actividad de p53 (Monte, Simonatto et al. 2006) y la sumoilación de PML3 (Peche, Scolz et al. 2012). También ha sido demostrada la interacción de proteínas MAGE con factores transcripcionales como MageA4/Miz-1 (Sakurai, Itoh et al. 2004) o MageA11/AR (Bai, He et al. 2005) cuyas funciones transcripcionales pueden ser reguladas a través de otros mecanismos (Ladelfa, Peche et al. 2012) (ver sección I-2.1.1).

Es importante destacar que en muchas células tumorales se observa una actividad alterada de HATs (histona acetil-transferasa) y/o HDACs (Jones and Baylin 2002). Esto se debe a que la acetilación/deacetilación de histonas controla la actividad de la cromatina y subsecuente transcripción génica. El balance de la acetilación nucleosomal de histonas juega un rol importante en la transcripción de muchos genes, siendo la hipoacetilación de histonas que mantiene una estructura más condensada de la cromatina y entonces resulta en la represión de la expresión de esos genes, mientras que la acetilación de las histonas se encuentra asociado con una estructura de la cromatina más abierta y la activación de la transcripción génica.

Comenzamos estos estudios verificando si el efecto inductor de MageB2 sobre la activación de E2F1 es efectivamente dependiente de las HDACs. El primer abordaje experimental que elegimos para comprender este mecanismo fue el tratamiento con TSA (Tricostatina A), un conocido inhibidor de las HDACs. Utilizamos el sistema de genes reporteros en las condiciones en las que la expresión de MageB2 activa la transcripción de E2F1, similar a la figura 11.A, pero con el agregado de 300 nM TSA por 24h. Luego, se procesaron las muestras para medir la actividad luciferasa correspondiente.

En la figura 13.A se observa que la activación de E2F1 por MageB2 es de 5 veces mayor con respecto a la ausencia de MageB2. También y como se esperaba, la inhibición de HDACs por TSA genera un aumento de la actividad transcripcional de E2F1. Sin embargo, contrariamente al incremento de 5 veces observado al sobre-expresar MageB2, la sobre-expresión de MageB2 no fue capaz de inducir significativamente la actividad del factor E2F1 en presencia de TSA (Figura 13.A). Este resultado sugiere que MageB2 requiere de la actividad de HDACs para aumentar la actividad del factor E2F1.

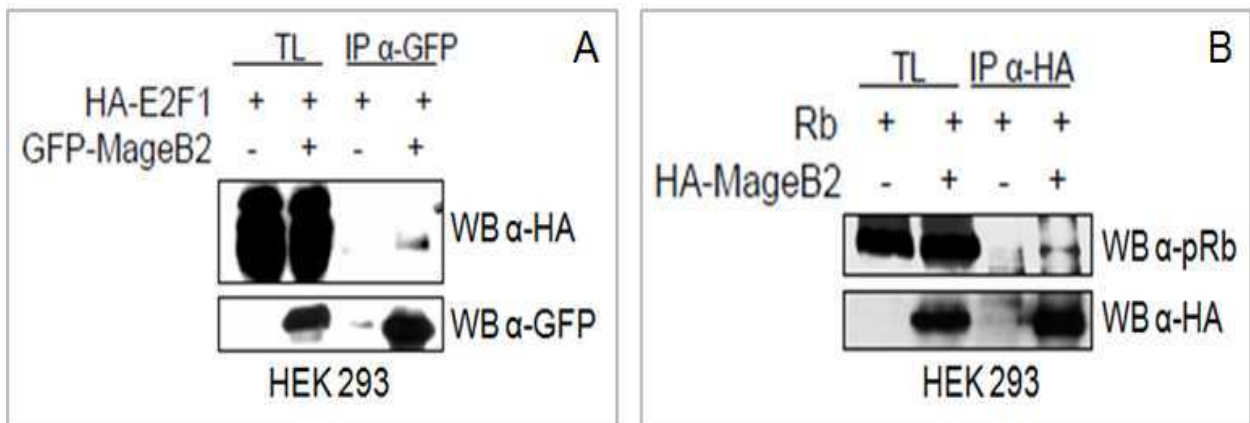


**Figura 13:** Ensayo de genes reporteros en células U2OS utilizando 6x E2F-Luc. Se evalúa la actividad de E2F1 en presencia (MageB2) o ausencia (VV) de Myc-MageB2. Se realiza el tratamiento con 300nM de TSA por 24hs (A). Western Blot de la expresión de Myc-MageB2 (B). Las barras de error indican el D.E.; se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa.

Como se mencionó previamente, la actividad inhibitoria de las HDACs sobre E2F1 está generalmente mediada por otras proteínas. Las principales proteínas capaces de inhibir E2F1 mediante el reclutamiento de HDACs son la proteínas *pocket* (familia de pRb). Según los resultados obtenidos, si MageB2 estuviera involucrado en la formación de estos complejos proteicos, debería tener la capacidad de impedir ese reclutamiento.

Considerando este escenario continuamos con el estudio de los complejos proteicos en los que MageB2 pudiera participar. La metodología elegida fue la de inmunoprecipitación (IP) de proteínas sobre-expresadas en células HEK 293.

Comenzamos con el estudio de la interacción entre MageB2 con el factor E2F1 (Figura 14.A) y con el supresor tumoral pRb (Figura 14.B). Las construcciones utilizadas son las que se muestran en la figuras. En ambos casos se observa una asociación débil con MageB2 considerando los niveles de expresión de E2F1 y pRb en los lisados totales (TL), lo que sugiere una baja probabilidad de interacción directa.

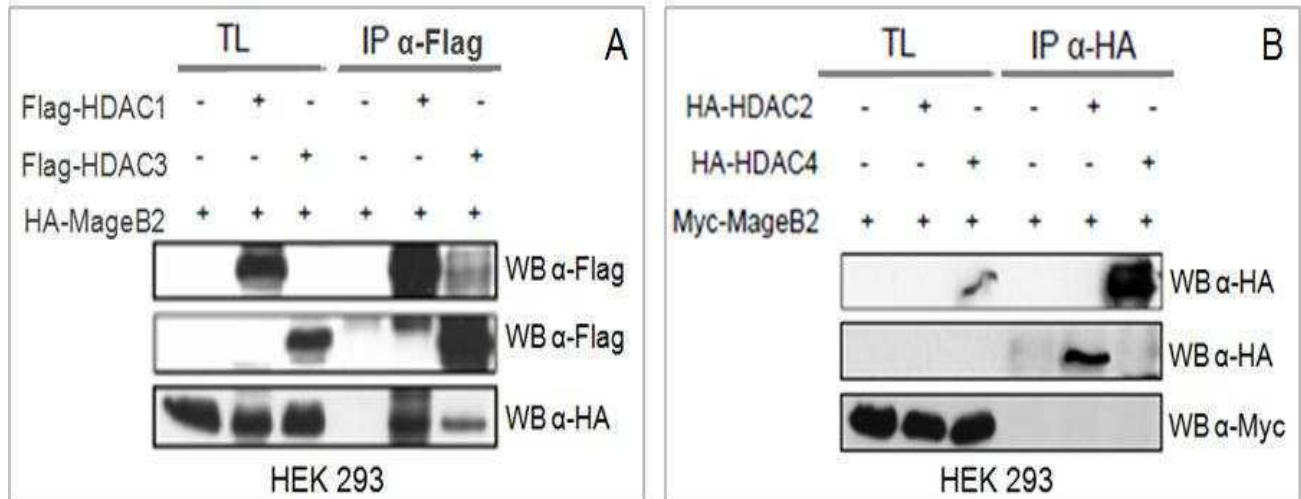


**Figura 14:** Western Blot de la inmunoprecipitación de GFP-MageB2 co-expresado con HA-E2F1 en células HEK 293 (A). WB de la IP de GFP-MageB2 co-expresado con pRb en células HEK 293 (B).

Como paso siguiente, y con los antecedentes de la unión entre proteínas MAGE-A y HDACs, indagamos si MageB2 era capaz de formar complejos con las HDACs. Para esto realizamos la inmunoprecipitación entre MageB2 y distintas HDACs (1, 2, 3 y 4) en forma similar a lo hecho con E2F1 y pRb. Como se observa en la Figura 15.A MageB2 co-

inmunoprecipita en complejo con HDAC1 y HDAC3 y se observa una mayor cantidad de proteína MageB2 co-purificada con HDAC1 que con HDAC3.

Contrariamente, HDAC2 y HDAC4 no traen asociado cantidades detectables de MageB2 en las mismas condiciones (Figura 15.B).

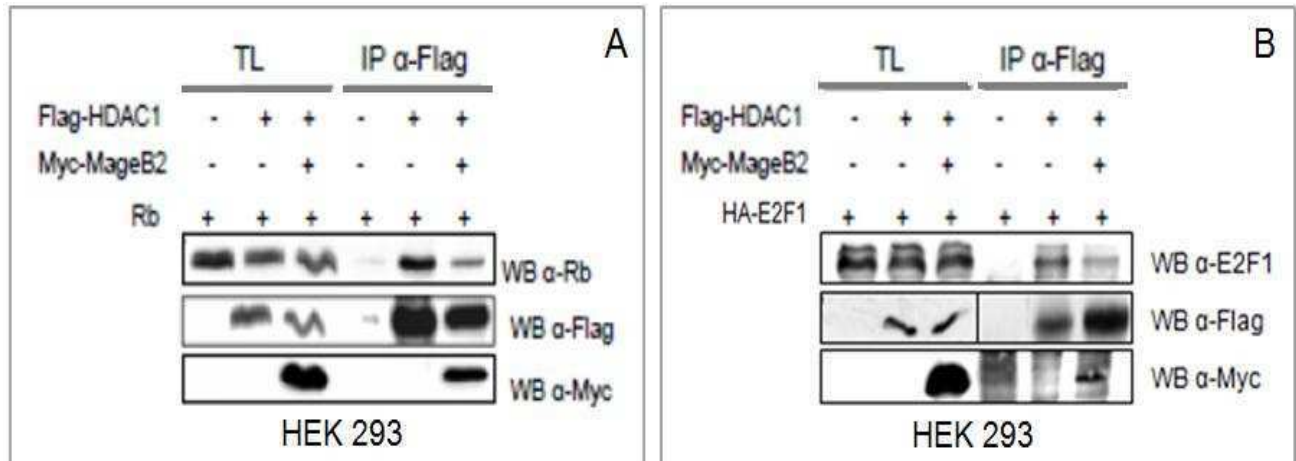


**Figura 15:** Western Blot de la inmunoprecipitación de Flag-HDAC1 o HDAC3 co-expresados con HA-MageB2 en células HEK 293 (A). WB de la IP de HA-HDAC2 o HDAC4 co-expresados con Myc-MageB2 en células HEK 293 (B).

Considerando que HDAC1 mostró una mayor interacción con MageB2 (comparado con otras HDACs o con E2F o pRb) y teniendo en cuenta la importancia de esta HDAC en la regulación de E2F1, elegimos HDAC1 para continuar evaluando la formación de los complejos proteicos.

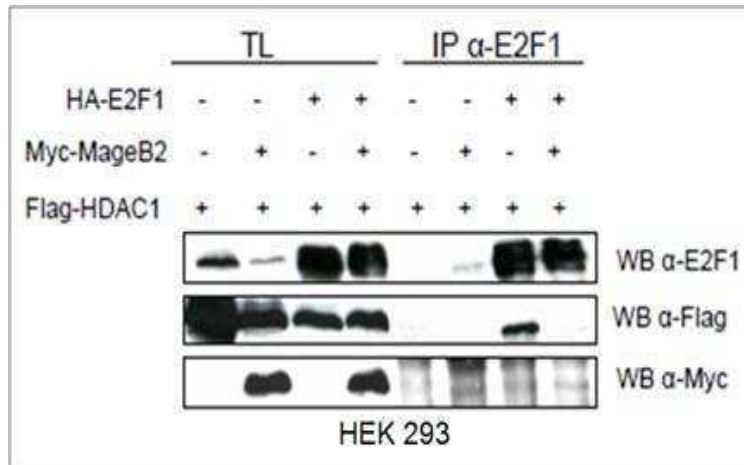
Seguidamente, estudiamos el efecto de la interacción MageB2/HDAC1 en la unión HDAC1/pRb. Con este fin, se realizó la inmunoprecipitación de Flag-HDAC1 y el Western Blot correspondiente contra pRb en presencia y ausencia de expresión de MageB2. Los resultados de este ensayo confirman la formación de un complejo MageB2/HDAC1 y muestran que la expresión de MageB2 interfiere en la formación del complejo proteico HDAC1/pRb (Figura 16.A).

En forma análoga, estudiamos el efecto de la interacción MageB2/HDAC1 en la formación del complejo E2F1 con HDAC1. Sobre-expresamos E2F1 con HDAC1 y analizamos la cantidad de E2F1 asociada a HDAC1 en presencia o ausencia de MageB2. Nuevamente, al igual que sucede con la proteína pRb, se observa una menor cantidad de la proteína E2F1 asociada a HDAC1 en presencia de MageB2 (Figura 16.B).



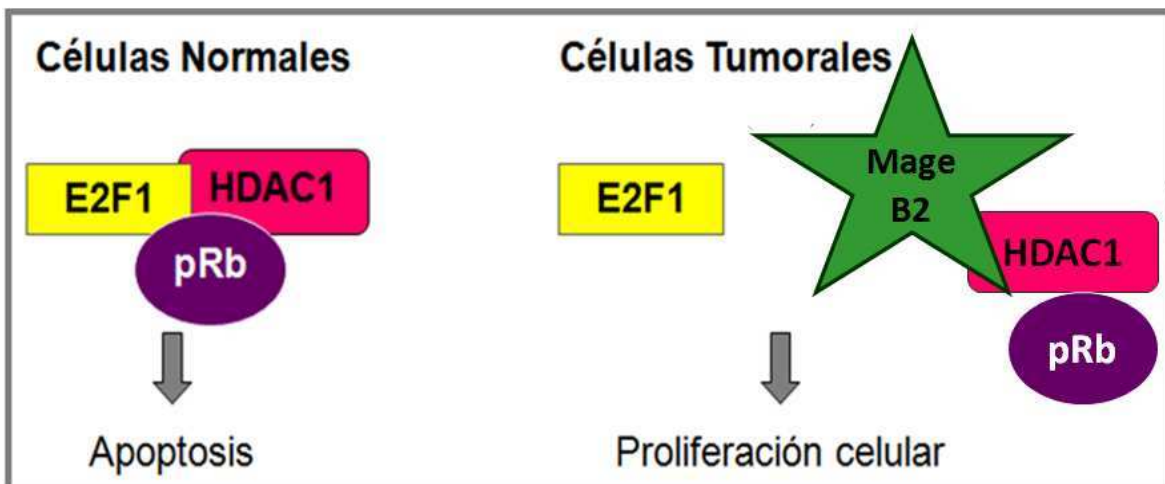
**Figura 16:** Western Blot de la inmunoprecipitación de Flag-HDAC1 con pRb en presencia (+) o ausencia (-) de Myc-MageB2 (A). WB de la IP de Flag-HDAC1 co-expresado con HA-E2F1 en presencia o ausencia de Myc-MageB2 en células HEK293 (B). WB de la inmunoprecipitación inversa de HA-E2F1 co-expresado con Flag-HDAC1 en presencia (+) o ausencia (-) de Myc-MageB2 en células HEK293 T.

Realizamos la inmunoprecipitación inversa para corroborar el efecto de la expresión de MageB2 en la formación del complejo que contiene a E2F1 y HDAC1. En este caso se inmunoprecipitó con un anticuerpo anti-E2F1 y se evaluaron los niveles de HDAC1 co-precipitados. Los resultados confirmaron una fuerte disminución en los niveles de HDAC1 asociados a E2F1 en presencia de MageB2 (Figura 17).



**Figura 17:** Western Blot de la inmunoprecipitación inversa de HA-E2F1 co-expresado con Flag-HDAC1 en presencia (+) o ausencia (-) de Myc-MageB2 en células HEK 293.

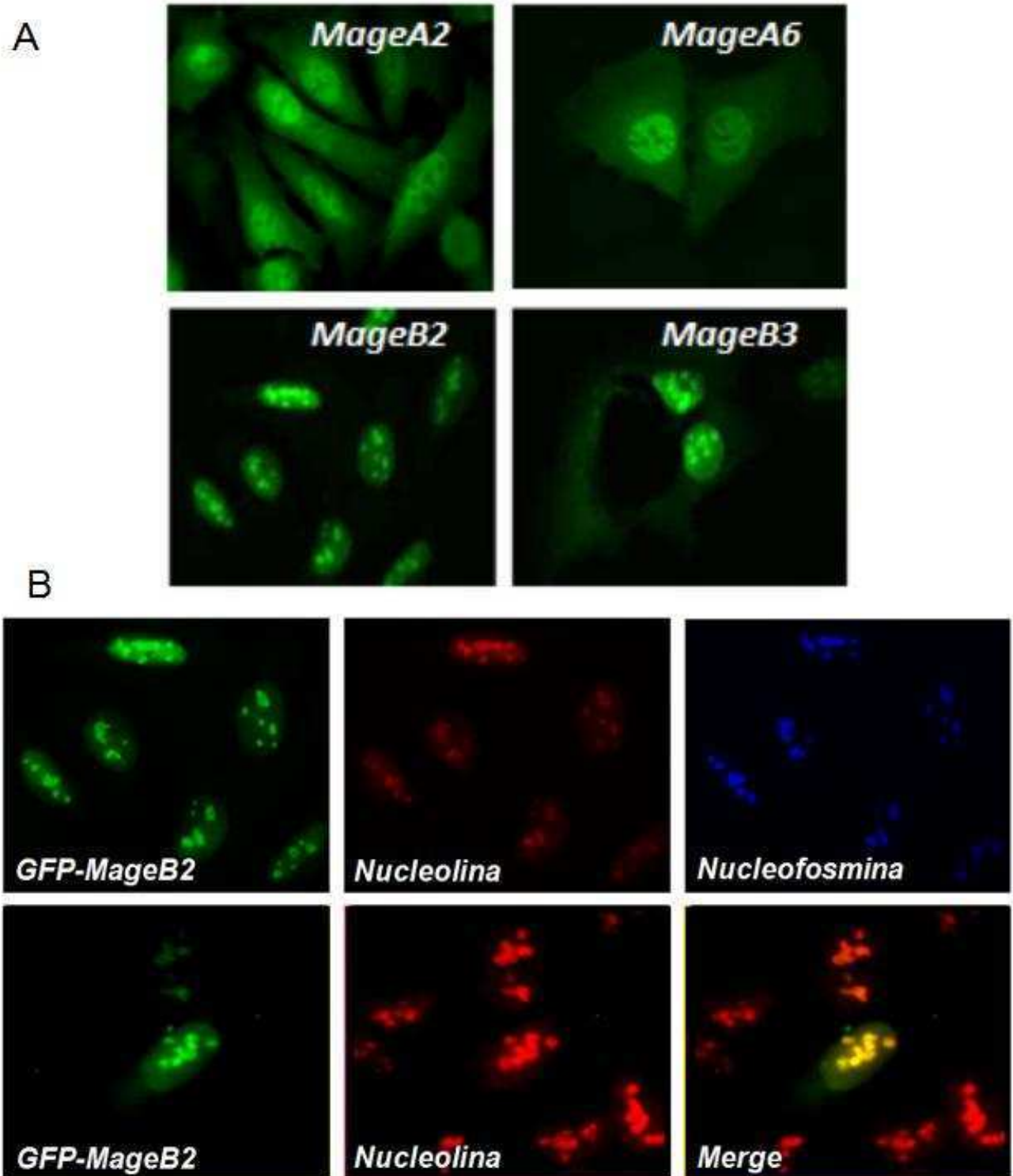
En conjunto estos resultados sugieren que el mecanismo por el cual MageB2 regula la actividad de E2F es interfiriendo en la formación del complejo inhibitorio HDAC1/pRb/E2F1, mediante la asociación de MageB2 con HDAC1. Como resultado se obtendría una aumentada fracción de E2F1 libre y activo (Figura 18).



**Figura 18:** Modelo representativo del complejo HDAC1/pRb/ E2F1 en presencia o ausencia de MageB2.

### 3. Localización celular de MageB2

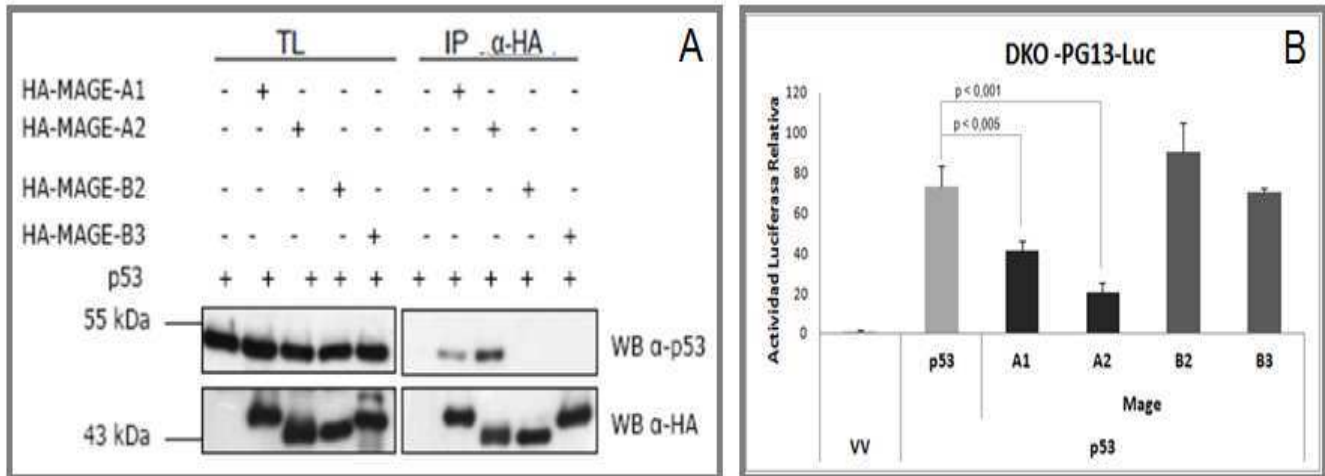
MageB2 es una proteína de 319 aminoácidos y con un MHD que comparte el 48% de homología con el MHD de las proteínas MAGE del subgrupo A. Previamente fue reportado que las proteínas Mage-A se encuentran en distintos compartimientos celulares, incluidos el núcleo (Monte, Simonatto et al. 2006), el citoplasma (Cheng, Liu et al. 2009), y los cuerpos nucleares (Peche, Scolz et al. 2012). Por el contrario, hasta el momento no se encuentran reportes sobre los miembros pertenecientes al subgrupo B. Para verificar su localización celular se clonaron los genes MageB2 y MageB3 en vectores pEGFP, de manera de obtener las proteínas fusionadas a la proteína GFP. Mediante el uso de un microscopio de fluorescencia se observa la diferencia en la localización celular de las proteínas Mage-A y Mage-B, en donde GFP-MageA2 y GFP-MageA6 son principalmente nucleares, mientras que GFP-MageB2 y GFP-MageB3 poseen además localización nucleolar (Figura 19.A). A través de la inmunofluorescencia indirecta (IFI) se puede observar la co-localización de GFP-MageB2 con marcadores específicos como la nucleolina y la nucleofosmina (Figura 19.B, merge).



**Figura 19:** Inmunofluorescencia en células U2OS de la expresión de GFP-MageA2, -A4, -B2 y -B3 (verde) (A). IF en células U2OS de la expresión de GFP-MageB2 (verde) y los marcadores de nucleólo: Nucleolina (rojo) y Nucleofosmina (azul). En el panel inferior se muestra la co-localización de MageB2 con Nucleolina (merge, amarillo) (B).



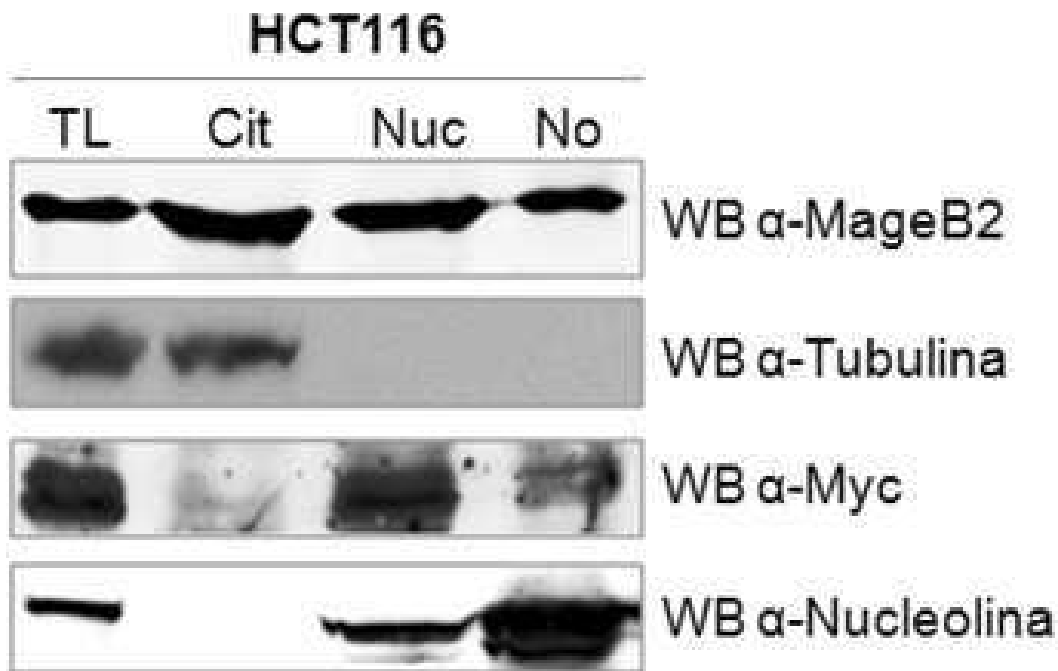
En forma similar a lo observado para MageB2, MageB3 tampoco interacciona con p53, ni ejercen efectos negativos sobre la actividad transcripcional de p53 comparado con MageA1 y MageA2 que interaccionan y reprimen a p53 (Figura 20).



**Figura 20:** Western Blot de la inmunoprecipitación de los distintos HA-Mage: -A1, -A2, -B2 y -B3 co-expresados con el factor p53 en células DKO (A). Ensayo de genes reporteros en células DKO, utilizando PG13-Luc. Se evalúa la actividad de p53 sobre-expresado en presencia de los distintos Mage: -A1, -A2, -B2 y -B3. Los valores están relativizados a la actividad luciferasa Renilla con promotor constitutivo (B).

Con el fin de estudiar la localización celular de MageB2 endógeno se utilizó el anticuerpo anti-MageB2 generado en este laboratorio, previamente mencionado. Dado que el anticuerpo no reconoce claramente a MageB2 endógeno en ensayos de inmunofluorescencia pero sí funciona para el revelado de Western Blot, analizamos la localización de MageB2 endógeno mediante un fraccionamiento subcelular. El fraccionamiento se realizó a través de la centrifugación diferencial de células HCT116 y nos permitió separar correctamente núcleo, nucléolo y citoplasma. En el Western Blot se muestran los distintos marcadores revelados: Tubulina como citoplasmático, c-Myc como marcador nuclear y la Nucleolina como marcador nucleolar. El revelado de MageB2 endógeno mostró su localización en el núcleo y el nucléolo, pero también en el citoplasma (Figura 21).

Seguidamente caracterizamos la secuencia de aminoácidos responsable de la localización nucleolar de MageB2. En cuanto a la presencia de MageB2 en la fracción citoplasmática nos llevó al desarrollo de una parte de este estudio que se presenta más adelante.



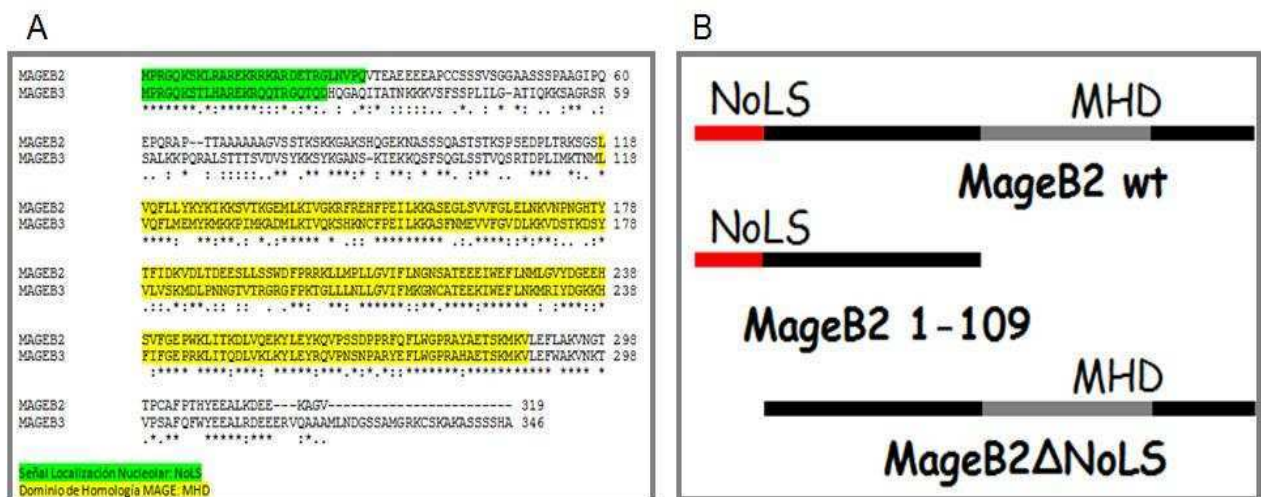
**Figura 21:** Western Blot del fraccionamiento subcelular de células HCT116. Se revela la presencia de MageB2 endógeno en los compartimentos celulares utilizando tubulina como marcador citoplasmático, c-Myc como marcador nuclear y Nucleolina como nucleolar (B).

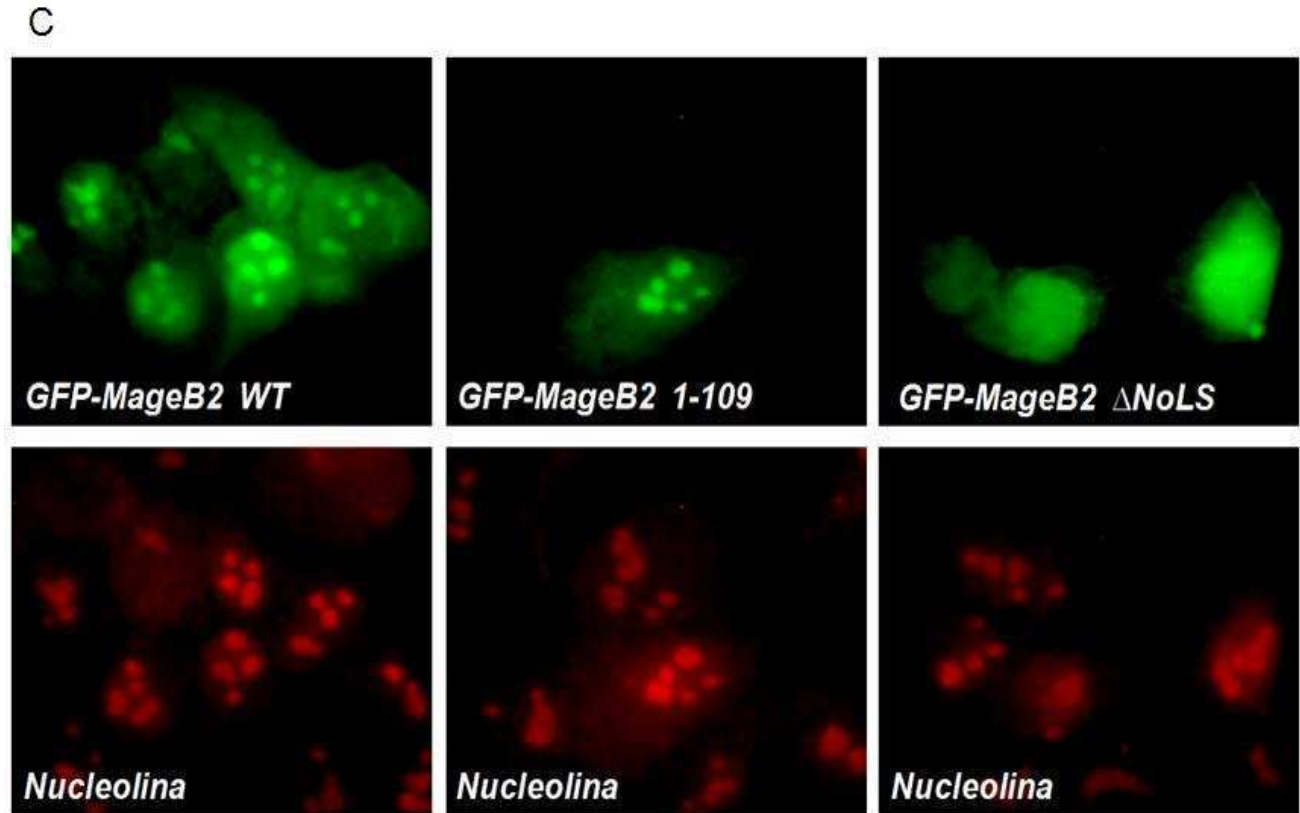
Como ya hemos mencionado, es conocido que los dominios MHD están conservados en todos los miembros de la familia MAGE-I, por esto sospechamos que su particular localización subcelular podría estar codificada en su extremo NT (amino-terminal) que va del aminoácido 1 al 109 y que se encuentra menos conservado. Como primera aproximación, realizamos una construcción que contenía esta región mencionada 1-109 de MageB2 fusionada a la proteína GFP (GFP-MageB2 1-109) (Figura 22.B). Luego de la transfección se realizó un ensayo de inmunofluorescencia que mostró que esta construcción GFP-MageB2 1-109 al igual que el GFP-MageB2 wt co-localiza en los nucléolos con el marcador Nucleolina (Figura 22.C). Conociendo este dato, que indicó que

la región comprendida entre el amino ácido 1 al 109 es funcional y suficiente para relocalizar a GFP al nucléolo, analizamos mediante herramientas bioinformáticas la existencia de una posible secuencia de localización nucleolar (NoLS) en el amino-terminal de MageB2.

Una de las herramientas utilizadas fue generada en colaboración con el Dr. Ignacio Sánchez (Grupo de Fisiología de Proteínas, Dpto de Química Biológica, FCEN-UBA). Ese nuevo algoritmo fue presentado en el Congreso Argentino de Bioinformática y Biología Computacional y fue parte de la tesis de licenciatura de Leandro Radusky (2011).

Los resultados obtenidos detectaron una potencial NoLS, rica en argininas y lisinas de 28 amino ácidos comprendida entre el aminoácido 2 al 29 (Figura 22.A). Seguidamente generamos una construcción de fusión a GFP conteniendo al gen MageB2 con la secuencia 2-29 deletcionada (GFP-MageB2  $\Delta$ NoLS) (Figura 22.B). En la inmunofluorescencia de la figura 22.C se comparan las dos construcciones mutantes con el GFP-MageB2 wt. Se observa que la región de la secuencia comprendida entre el amino ácido 1 al 109 es capaz de localizar a la proteína GFP en el nucléolo, mientras que la deleción de la región 2-29 (NoLS) causa la deslocalización del nucléolo hacia el compartimento nuclear (figura 22.C).





**Figura 22:** Comparación de la secuencia aminoacídica de las proteínas MageB2 y -B3, en verde se marca la secuencia NoLS y en amarillo el dominio MHD (A). Esquema representativo de las distintas construcciones de secuencias de GFP-MageB2 (B). Inmunofluorescencia en células U2OS de la expresión de GFP-MageB2 wt, y las construcciones mutantes que contienen: la región amino-terminal 1 a 109 (GFP-MageB2 1-109) o la delección de la NoLS (GFP-MageB2  $\Delta$ NoLS) (verde). Se utiliza como marcador nucleolar a la proteína Nucleolina (rojo) (C).

Estos resultados indican que MageB2 es dirigido al nucléolo por una secuencia canónica NoLS, localizada en su extremo amino terminal, lo que confirma que a pesar que las proteínas MAGE-I comparten un dominio MHD altamente conservado, su localización y función dependen también de cortos motivos presentes fuera del dominio MHD.

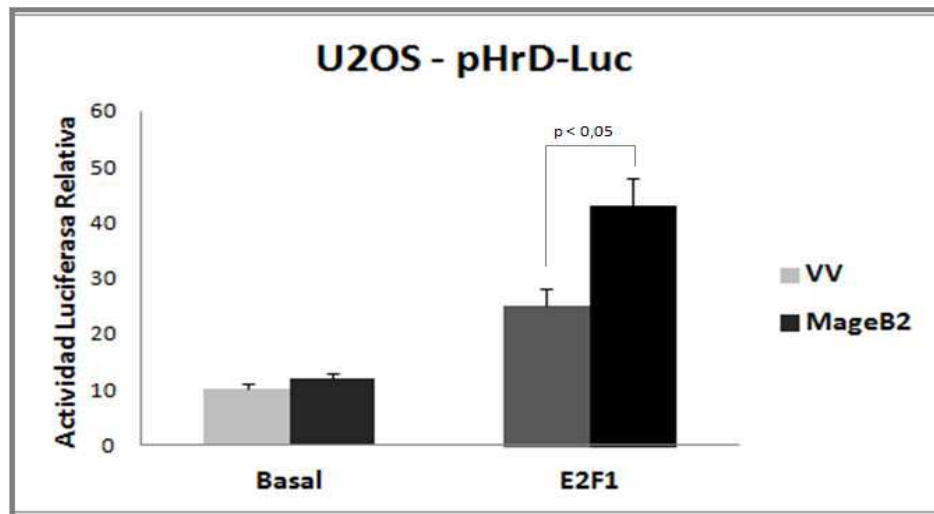
#### 4. Relación entre MageB2 y los ribosomas

Los datos sobre la localización nucleolar de MageB2 concuerdan con datos previamente obtenidos en colaboración con el laboratorio LNCIB de Trieste, en la cual se

había realizado un análisis por espectrometría de masa (MS) de las proteínas asociadas a MageB2. Los resultados mostraron la interacción de MageB2 con algunas proteínas nucleolares (Nucleolina) y varias proteínas ribosomales (S8, S9, S13 y L27a). Estudios subsiguientes mostraron que en una gran proporción, esta asociación dependía de la integridad del ARN ribosomal (dato no mostrado), lo que sugería que MageB2 en los nucléolos está asociado a los ribosomas.

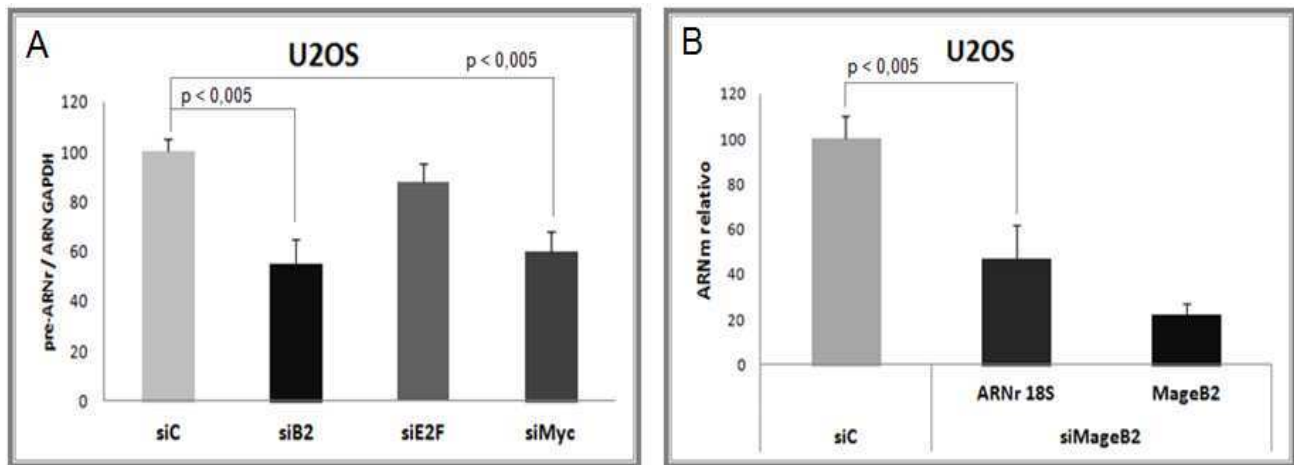
#### 4.1. MageB2 y los ribosomas nucleares

Dado que MageB2 induce a E2F1 y este se encuentra vinculado a la transcripción de ARNr (ARN ribosomal), evaluamos si MageB2 era capaz de activar a E2F1 en este rol. Para eso, como primera aproximación, utilizamos una construcción que contiene el promotor del gen del ARNr regulando el gen reportero Luciferasa (pDrRNA-LUC). Mediante este ensayo observamos que MageB2 también activa esta función de E2F1 (Figura 23).



**Figura 23:** Ensayo de genes reporteros midiendo la actividad transcripcional Basal o del factor E2F1 sobre-expresado en presencia o ausencia de MageB2, co-transfectados junto al gen reportero luciferasa Firefly bajo el promotor correspondiente al ADN ribosomal. Se relativizaron las muestras a la actividad de la luciferasa Renilla. Las barras de error indican el D.E.; se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa.

Como segunda aproximación, silenciamos la expresión de MageB2 mediante siRNA (siB2 y siC) y determinamos los niveles de síntesis del ARN precursor ribosomal (pre-ARNr) en células U2OS. Esa determinación se realizó mediante RT-qPCR utilizando cebadores que reconocen la versión no procesada del ARNr. Como se muestra en la figura 24.A el KD de MageB2 correlaciona con una disminución la transcripción del ARNr. Sumado a este ensayo realizamos otro similar para cuantificar, en este caso, la cantidad de ARNr maduro 18S, y nuevamente correlacionado al *primer* resultado se observa una disminución de la cantidad de ARNr 18S al silenciar a MageB2 (Figura 24.B). Estos resultados indican que MageB2 estimula la producción de ARNr.

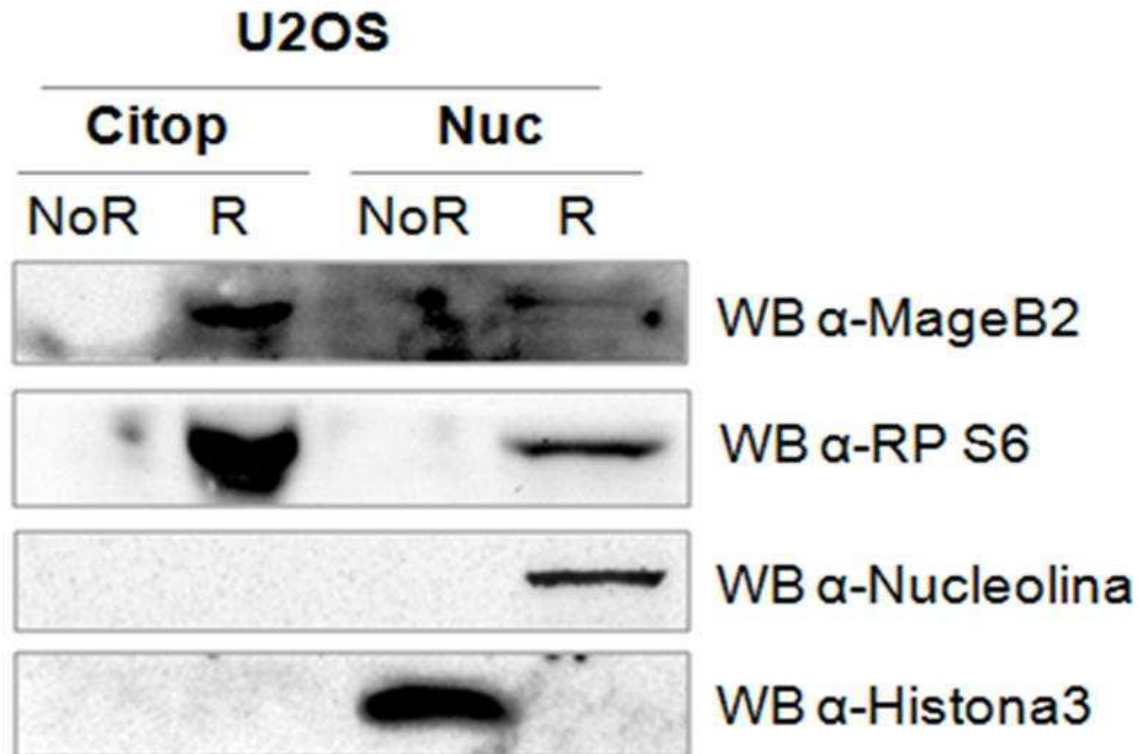


**Figura 24:** Cuantificación de ARN ribosomal precursor (pre-ARNr) relativizado a la cantidad de ARN mensajero de GAPDH mediante RT-qPCR, transfectando los siRNA contra MageB2 o E2F o c-Myc (A). RT-qPCR del ARN ribosomal maduro correspondiente al 18S mediante el silenciamiento de MageB2 en células por siRNA contra el MageB2 endógeno (B). Las barras de error indican el D.E.; se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa.

## 4.2. MageB2 y los ribosomas citoplasmáticos

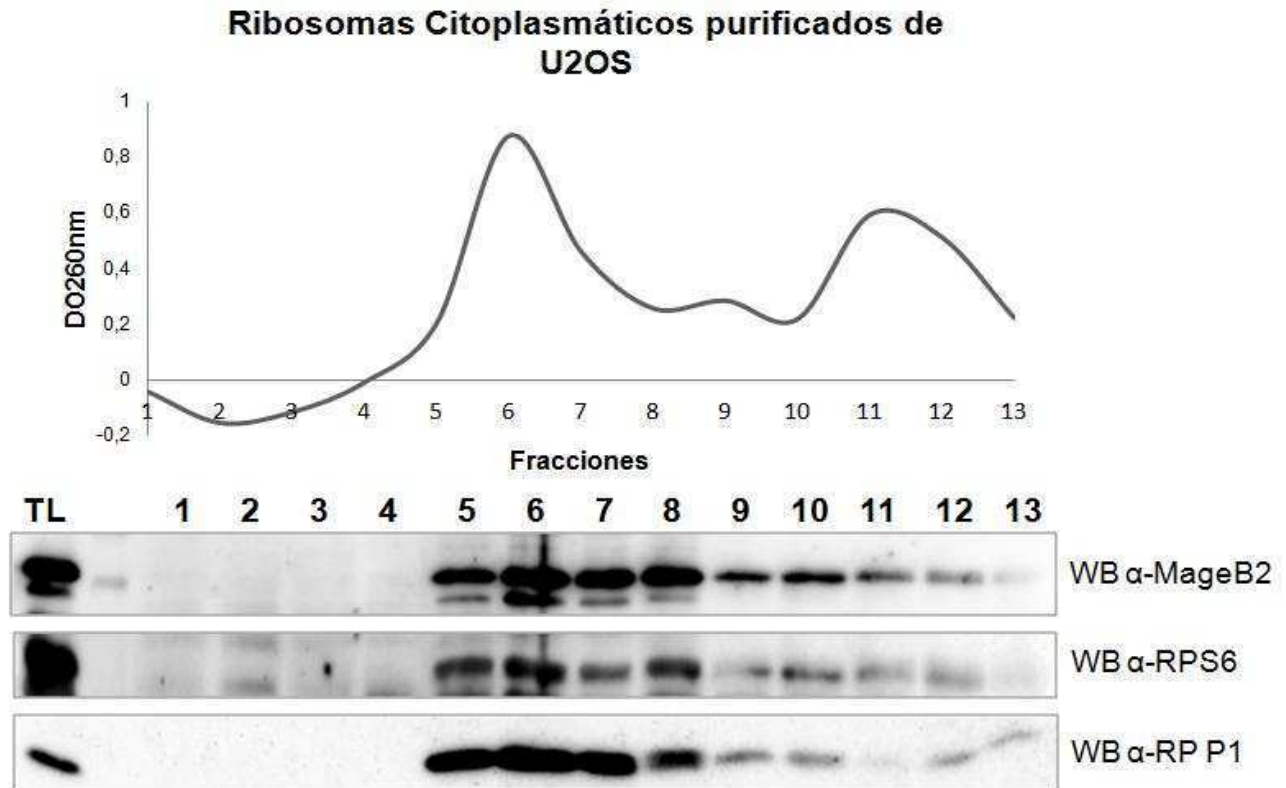
Las evidencias obtenidas en el punto 5.1 sugieren que MageB2 es muy relevante para la síntesis de ARNr, evento que ocurre en el nucléolo. Sin embargo, los datos de IP/MS y otros, indicaban que MageB2 se asocia a los ribosomas. Estos resultados nos llevaron a evaluar la asociación entre la proteína MageB2 endógena y los ribosomas. Para ello se puso a punto la técnica de centrifugación diferencial para purificar ribosomas provenientes del núcleo y del citoplasma mediante la ultracentrifugación en colchón de sacarosa. La

proteína ribosomal S6 (PR S6) fue utilizada como marcador ribosomal, y sorprendentemente para nosotros, se observa que MageB2 endógeno también se encuentra co-purificado en las fracciones ribosomales citoplasmáticas (Figura 25).



**Figura 25:** Western Blot de la purificación por ultracentrifugación en colchón de sacarosa de ribosomas de la fracción citoplasmática y nuclear de células U2OS. Se utiliza RPS6 como marcador de ribosomas e Histona3 como nuclear.

Para confirmar los resultados, analizamos el perfil de polisomas en gradiente de sacarosa continuo de los ribosomas citoplasmáticos purificados de células U2OS. En la figura 26 se observa el pico correspondiente al 80S ribosomal y los polisomas determinado por la detección conjunta de las proteínas ribosomales S6 correspondiente a la subunidad menor 40S y P1 correspondiente a ribosomas completos 80S. Si bien no pudimos separar los monosomas, podemos corroborar que MageB2 endógeno se encuentra asociado a las fracciones correspondientes a ribosomas completos 80S y a los polisomas funcionalmente activos en el proceso de la traducción celular.



**Figura 26:** Perfil de polissomas en gradiente continuo 10 a 30% de sacarosa de la purificación de ribosomas citoplasmáticos de células U2OS. La lectura de la absorbancia del ARN a DO 260nm de las distintas fracciones del gradiente genera el perfil de polissomas. Los picos obtenidos en este perfil se determinan según las proteínas que se revelen en el Western Blot inferior. Se utiliza la PR S6 como marcador de la subunidad menor; y la PR P1 como marcador de ribosomas completos.

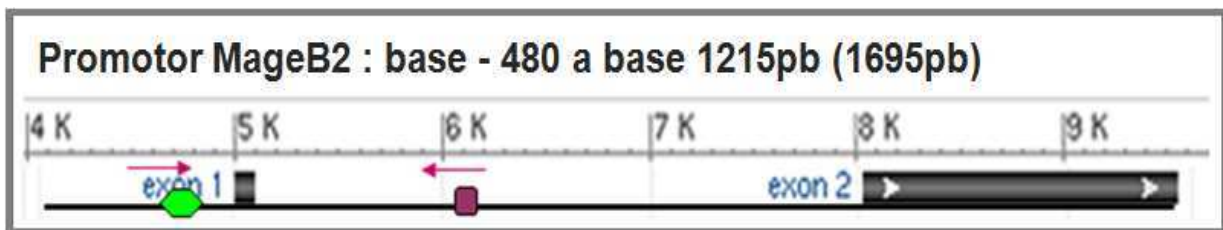
Estos resultados sugieren una estrecha asociación entre MageB2 y los ribosomas. MageB2 podría estimular la transcripción de ARNr en el nucléolo y luego quedar asociado a los ribosomas durante la maduración para formar parte de ellos cuando llegan al citoplasma. Esta interacción entre MageB2 y los ribosomas funcionales nos lleva a pensar que podría estar involucrado en la traducción proteica, proceso que se encuentra exacerbado en células tumorales. Los datos obtenidos sobre este punto son preliminares y no fueron incluidos en esta Tesis.



## 5. Regulación del promotor de MageB2

Como última caracterización de MageB2 abordamos el estudio de su regulación génica. El primer indicio sobre la regulación de genes *mage-I* que nos interesó mucho fue la observación realizada por el grupo de Bruno Amati (Fernandez, Frank et al. 2003) dónde mediante inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) identificaron un gran número de fragmentos genómicos de unión del oncogén c-Myc; entre ellos un fragmento del promotor de MageA3. Mediante el análisis *in silico* de distintos promotores de genes *mage-I*, hallamos que efectivamente el promotor de MageA3 posee un potencial sitio de unión para c-Myc (*E-box*). Seguidamente analizamos de la misma manera el promotor de MageB2, en el cual encontramos un E-Box para c-Myc y también una secuencia consenso correspondiente al factor E2F.

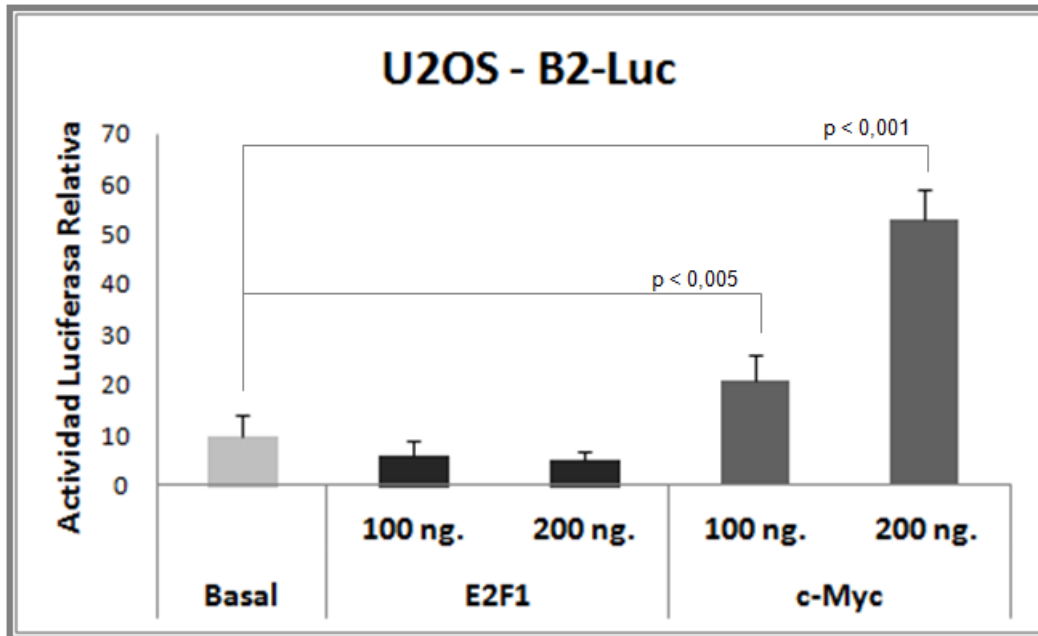
Con el objetivo de comprender si alguno o ambos sitios eran funcionales, diseñamos *primers* para amplificar y clonar el promotor de MageB2 río arriba del gen reportero *Firefly* luciferasa (pGL3-LUC). El fragmento genómico de MageB2 comprende aproximadamente 1700 bases (entre la bases -480 y 1215). De esta manera obtuvimos la construcción pMageB2-LUC (B2-LUC) (Figura 27).



**Figura 27:** Sitios consenso de pegado de los factores c-Myc en púrpura (1102pb) y E2F en verde (-264pb) respectivamente. Las flechas indican los *primers* diseñados para levantar la secuencia promotora a ser clonada.

Realizamos los ensayos de genes reporteros con el vector B2-Luc obtenido y la co-transfección con los factores c-Myc o E2F1 respectivamente. Los resultados indicaron que la transactivación de c-Myc aumenta significativamente la actividad luciferasa; sin

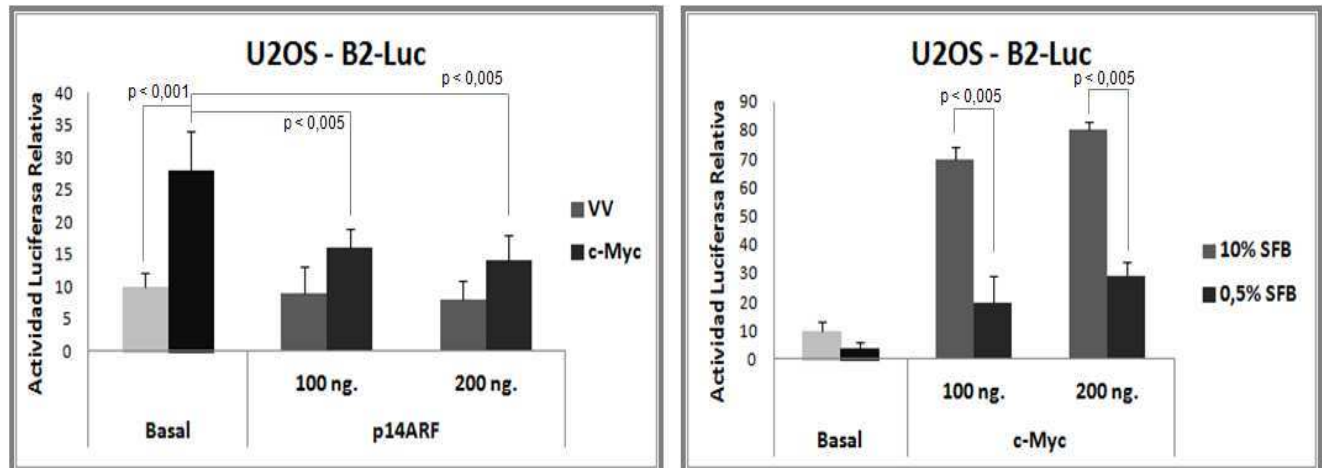
embargo, el factor E2F1 no fue capaz de activar a este promotor directamente (Figura 28). Estos resultados indican que: por un lado, c-Myc podría ser capaz de activar la expresión de genes *mageB2*; sin embargo, no sucedería para el caso de genes *mageA3*, ya que se observó activación del gen de la luciferasa por el clonado del promotor de *MageA3*; y por otro lado, el factor E2F no sería activador transcripcional de *MageB2*.



**Figura 28:** Ensayo de genes reporteros midiendo la actividad transcripcional del factor E2F1 o c-Myc sobre-expresados en distintas concentraciones de los respectivos vectores, co-transfectados junto al gen reportero luciferasa *Firefly* bajo el promotor clonado de *MageB2*. Se relativizaron las muestras a la actividad de la luciferasa Renilla. Las barras de error indican el D.E.; se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa.

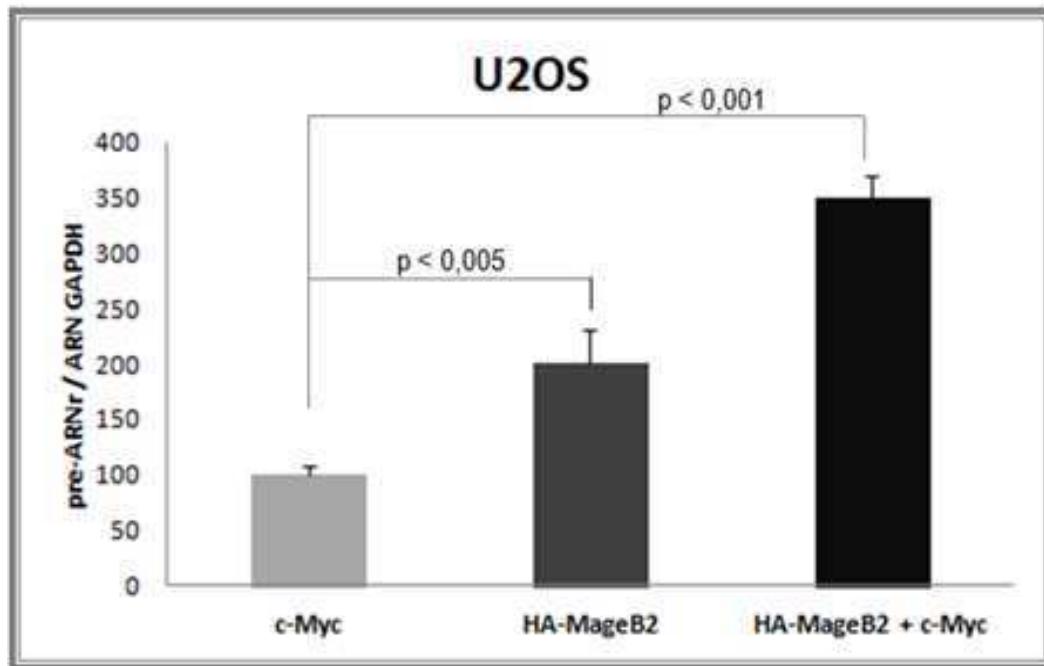
Para confirmar estos datos, nos focalizamos en analizar el efecto de algunos inhibidores de c-Myc como p14ARF (Figura 29.A); o por otro lado la privación de suero en el medio de cultivo (Figura 29.B). Nuestros resultados sostienen la potencial regulación de la expresión de *MageB2* por c-Myc: ya que el inhibidor de c-Myc, el supresor p14ARF es capaz de disminuir su transactivación sobre B2-LUC, y la falta de factores de crecimiento, también, regula negativamente a B2-LUC. Esto podría deberse a dos motivos,

unos que sea dependientes de la activación de c-Myc por los factores de crecimiento y/o independiente de c-Myc, siendo una inducción directa de MageB2 para aumentar la proliferación celular.



**Figura 29:** Ensayo de genes reporteros del vector B2-Luc de la actividad transcripcional del factor c-Myc: en presencia de p14ARF a distintas concentraciones (A) o en ausencia de SFB (B). Los resultados son relativos a la actividad luciferasa Renilla co-transfectada. Las barras de error indican el D.E.; se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa.

Es conocido que c-Myc es un importante inductor de la síntesis de ARNr. En este contexto y habiendo observado que MageB2 también colabora en este proceso, comparamos el potencial de MageB2 y c-Myc en este proceso así como el efecto de la co-expresión de ambos. Mediante la cuantificación de pre-ARNr por RT-qPCR, nuestros resultados muestran un incremento de pre-ARNr por la sobre-expresión MageB2 comparado al de c-Myc solo, y además un incremento de casi 4 veces de pre-ARNr al co-expresar c-Myc y MageB2 (Figura 30).



**Figura 30:** Cuantificación de ARNr precursor relativizado a la cantidad de ARNm de GAPDH mediante RT-qPCR, transfectando el vector que expresa c-Myc o HA-MageB2 o ambos co-expresados. Las barras de error indican el D.E.; se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa.

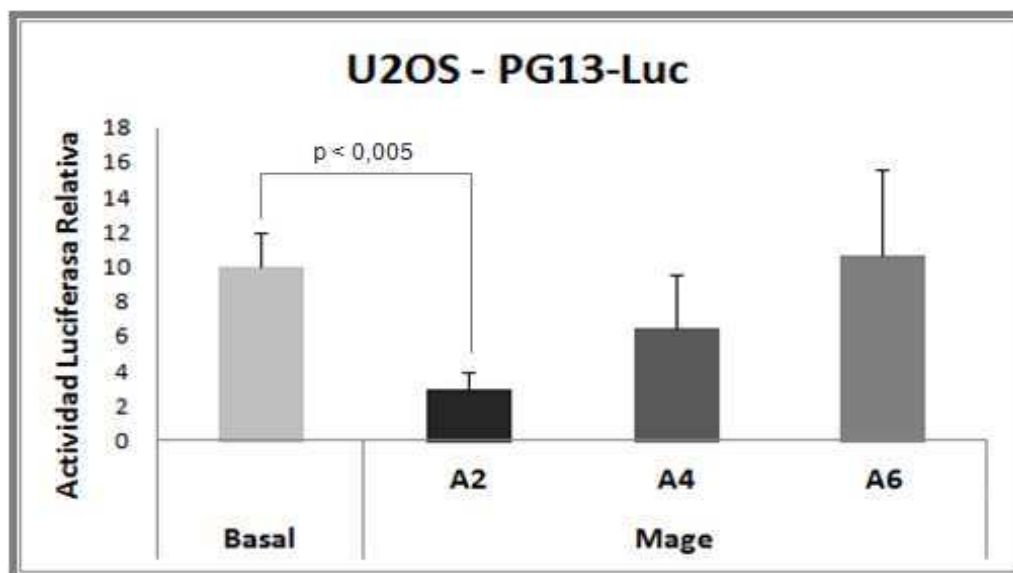
En conjunto todos estos datos nos dan indicios de una retro-alimentación positiva de la regulación de genes oncogénicos. En este caso, el gen *mageB2* que es regulado positivamente por el factor c-Myc, que a su vez la proteína MageB2 es capaz de inducir la transactivación de E2F por medio del reclutamiento de HDACs, para que E2F sea capaz de transactivar genes pro-proliferativos como c-Myc. Los tres factores pueden incrementar su función pro-proliferativa en forma sinérgica a través distintos procesos como la del aumento del ARNr o la inducción de otros genes capaces de estimular la progresión del ciclo celular.

## Parte 2: Caracterización de inhibidores de MageA2 humano

---

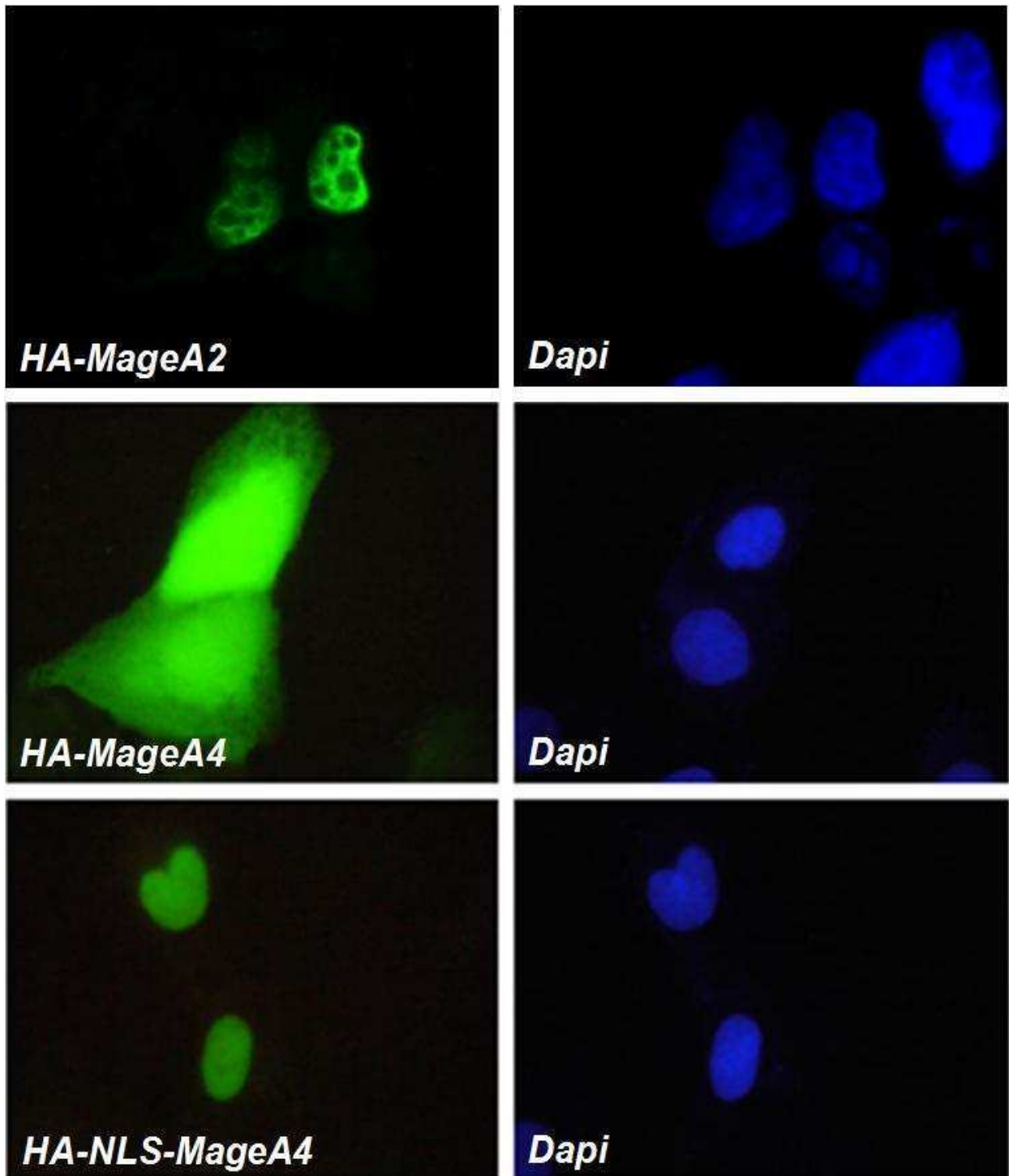
### **6. Especificidad de diferentes Mage-A en la capacidad inhibitoria sobre p53**

Dado que nuestros datos previos muestran a MageA2 como un represor de la actividad transcripcional de p53 (Monte, Simonatto et al. 2006) y los trabajos que indican que MageA4 se une al factor de transcripción Miz1 y reprime p21 (Sakurai, Itoh et al. 2004) o que MageA6 es capaz de estabilizar a MageA11 en la activación de AR en células de cáncer de próstata (manuscrito en preparación, Laiseca 2015), nosotros acá sugerimos que potencialmente los Mage-A podrían ser reguladores de factores transcripcionales específicos y no necesariamente tener actividades redundantes. Para confirmar esta hipótesis realizamos ensayos de genes reporteros transfectando el vector que contiene un promotor sintético que responde al factor p53 río arriba del gen de la luciferasa Firefly (PG13-Luc) junto con distintos vectores que expresan las proteínas MageA2, -A4 y -A6. En la figura 31 podemos observar cómo MageA2 ejerce un mayor grado de represión sobre la actividad de p53 comparado con MageA4 y que el MageA6 no es capaz de reprimirlo.



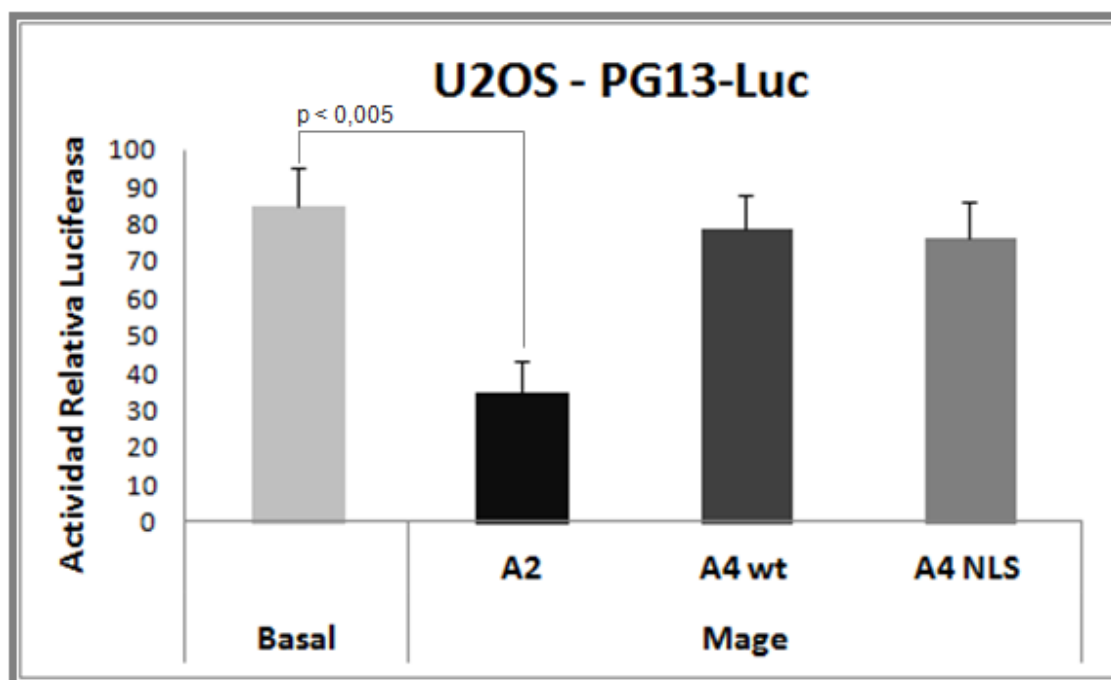
**Figura 31:** Ensayo de genes reporteros utilizando el vector PG13-Luc que responde al factor p53 y el vector Renilla para relativizar la actividad medida en células U2OS. Se transfectan los vectores que expresan HA-MageA2, MageA4, MageA6 o un vector vacío que se mide como el Basal. Las barras de error indican el D.E.; se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa.

A diferencia del MageA2 que es principalmente nuclear, MageA4 (que contiene un 70% de homología con MageA2) posee una localización distribuida entre el núcleo y el citoplasma, y además no co-localiza con PML3 ni reprime al factor p53 (Peche, Scolz et al. 2012). Para entender si esta función depende de su localización celular, realizamos una construcción NLS-MageA4, agregando una secuencia de localización nuclear (NLS). De esta manera realizamos el clonado de un fragmento de ADN correspondiente a la secuencia NLS consenso de la proteína viral de HIV en el vector que expresa a HA-MageA4 dando como resultado el vector HA-NLS-MageA4. Una vez obtenida la nueva construcción del vector realizamos la inmunofluorescencia correspondiente a HA-MageA2, -A4 wt y NLS-A4 en células U2OS (Figura 32). Observamos que HA-NLS-MageA4 se relocaliza completamente al núcleo al igual que HA-MageA2.



**Figura 32:** Inmunofluorescencia de la expresión de HA-MageA2, -A4 y NLS-A4 (verde) y la tinción nuclear con dapi (azul) en células U2OS.

Para entender si el efecto de represión que ejerce MageA2 sobre el factor p53 depende de su localización nuclear, realizamos los ensayos de genes reporteros transfectando los tres vectores que expresan HA-MageA2, -A4 wt y NLS-A4 para comparar si el NLS-MageA4 re-localizado en el núcleo se comporta como MageA2 reprimiendo a p53. Como se observa en la figura 33 NLS-MageA4 se comporta como MageA4 wt y no como MageA2, sugiriendo que a pesar de la homología de secuencia de esta sub-familia de proteínas no necesariamente conlleva a una función redundante sino específica de cada uno de los miembros.



**Figura 33:** Ensayo de genes reporteros utilizando el vector PG13-Luc y co- transfectando los vectores que expresan MageA2, MageA4 y NLS-MageA4. Se utiliza el vector Renilla para relativizar la actividad medida en células U2OS. Las barras de error indican el D.E.; se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa.



## 7. Regulación de la actividad de MageA2 sobre p53

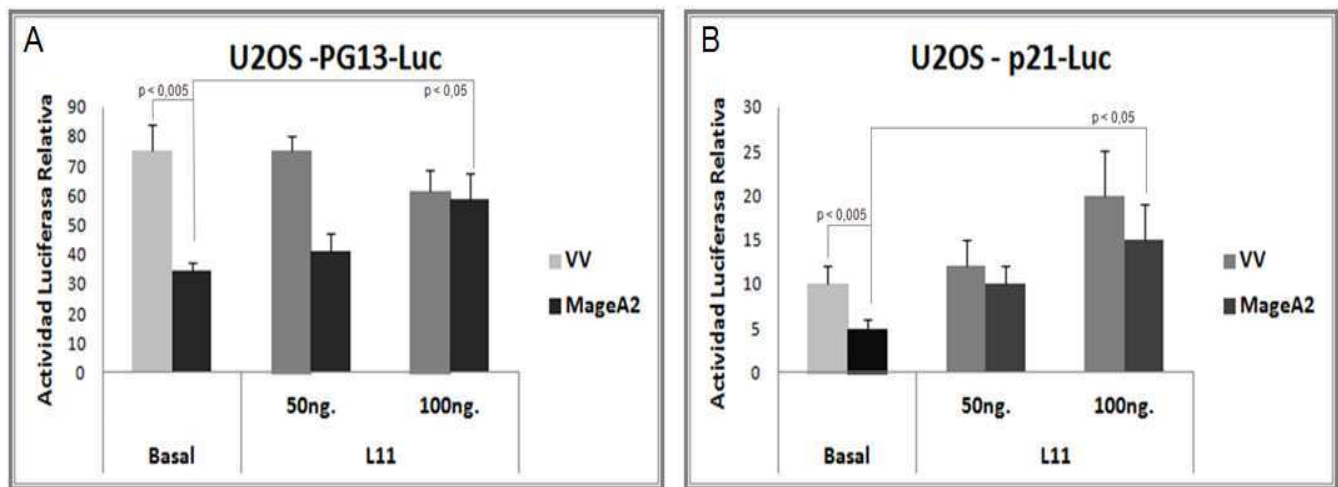
Comenzando con la búsqueda de posibles reguladores de MageA2, decidimos analizar el efecto que podrían tener conocidos activadores de la vía p53. Se ensayaron varias proteínas como ser: PML3, la proteína que activa a p53 para llevar a senescencia celular (Fogal, Gostissa et al. 2000); p300, una acetil-transferasa capaz de estabilizar a p53 (Grossman 2001); MageD1, una proteína de la familia de los MAGE-II capaz de llevar a la apoptosis celular mediada por p53 (Wen, Xue et al. 2004, Du, Zhang et al. 2009) o Nucleofosmina, un competidor de p14ARF por Mdm2 (Gjerset 2006, Chen, Shan et al. 2010). Sin embargo, ninguno de estos activadores de la vía de p53 fueron capaces de contrarrestar el efecto inhibitorio que MageA2 ejerce sobre el oncosupresor (datos no mostrados).

A pesar de estos resultados negativos, pudimos encontrar algunas proteínas con la capacidad de regular negativamente la actividad de MageA2 sobre p53. A continuación describimos una nueva función de la proteína ribosomal L11 y del oncosupresor p14ARF como potenciales proteínas capaces de suprimir, en parte, la actividad represora de MageA2 sobre p53

### 7.1. Proteína Ribosomal L11 como regulador de MageA2

Mediante bibliografía encontramos que la proteína ribosomal L11, no sólo es una proteína que forma parte de la subunidad mayor de los ribosomas, sino que también tiene funciones independientes que confieren la inhibición de Mdm2 cuando censa un estrés ribotóxico, relocalizándose de los nucléolos al núcleo para inducir al factor p53 mediante el mismo mecanismo de "secuestro" de Mdm2 que ejerce p14ARF (Zhang, Wolf et al. 2003, Dai, Challagundla et al. 2012, Morgado-Palacin, Llanos et al. 2012). Esta proteína ribosomal L11 nos llamó particularmente la atención por el hecho que MageB2 se encuentra localizado en los nucléolos al igual que L11, por lo cuál si L11 fuera capaz de modular a MageA2 probablemente MageB2 podría estar inhibiéndolo como un efecto de

regulación positiva de MageA2. Por todo ello comenzamos analizando que efecto tiene L11 sobre la actividad transcripcional de p53 cuando MageA2 se encuentra co-expresado. Una vez más mediante ensayos de genes reporteros medimos la respuesta de la actividad luciferasa transactivada por el oncosupresor p53 utilizando el vector reportero PG13-Luc (un promotor sintético que contiene sitios específicos para p53), al estar co-expresados RP L11 y MageA2 (Figura 34). Además repetimos el ensayo utilizando el vector reportero p21-Luc, este vector contiene la secuencia promotora del gen p21 que es regulado por p53 así también como otros factores (Figura 34.B).

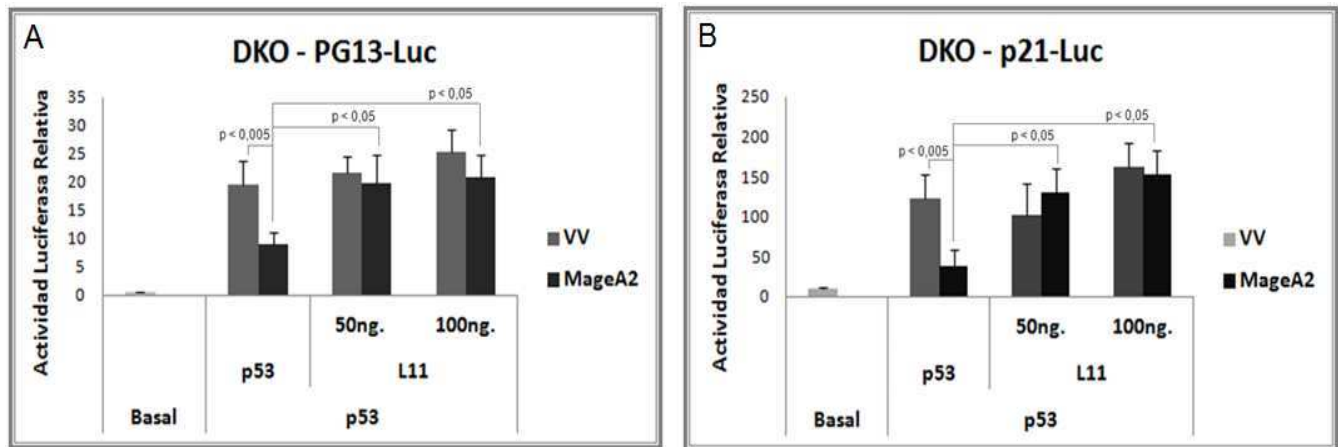


**Figura 34:** Ensayo de genes reporteros utilizando el vector PG13-Luc y co- transfectando los vectores que expresan L11 en dos concentraciones 50ng. o 100ng. y 50ng. de MageA2 (A). Idem anterior con el vector p21-Luc (B). En ambos casos se utiliza el vector Renilla para relativizar la actividad medida en células U2OS. Las barras de error indican el D.E.; se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa.

Nuestros datos indican que a mayores concentraciones del vector Myc-L11 transfectado se genera un aumento significativo de la actividad de p53 aún en presencia de MageA2. Estos datos sugieren que RP L11 es capaz de revertir la represión que MageA2 ejerce sobre la transactivación de p53.

Dado que RP L11 para inducir y mantener activado a p53 reprime al conocido inhibidor de p53, Mdm2, buscamos un sistema para repetir los ensayos anteriores independizándonos de Mdm2. De esta manera, realizamos los mismos ensayos de genes

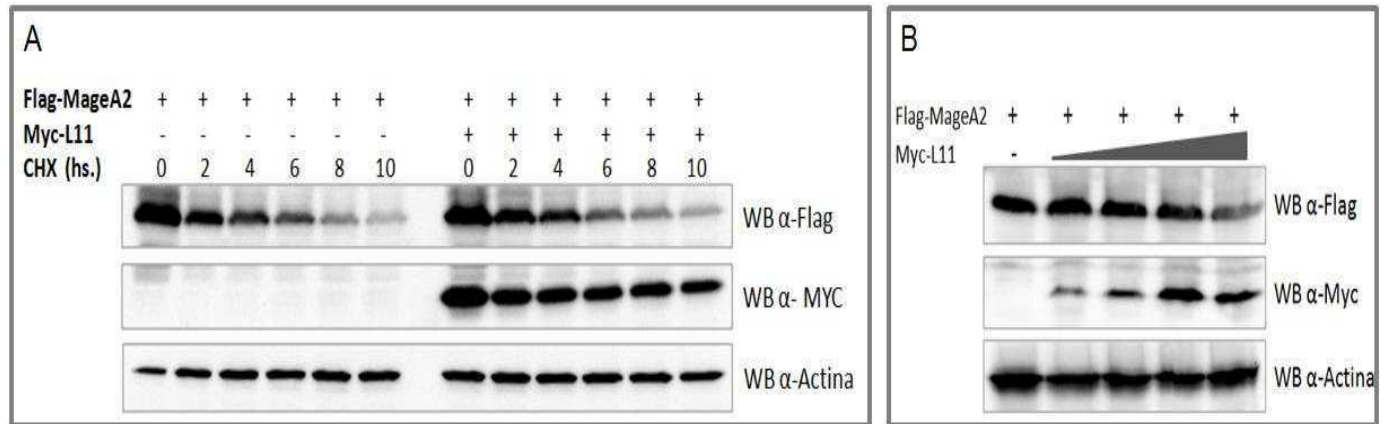
reporteros en las células DKO, como ya hemos mencionado en la primera parte este sistema de células tiene la particularidad de ser fibroblastos embrionarios murinos con  $p53^{-/-}$  y  $Mdm2^{-/-}$ , así sin la presencia de Mdm2 logramos medir la actividad del factor p53 sobre-expresado y co-transfectado con las proteínas RP L11 y MageA2. Los resultados sugieren que la presencia RP L11 genera un aumento significativo de la actividad transcripcional de p53, revirtiendo la inhibición provocada por MageA2, incluso a concentraciones menores del vector Myc-L11 que no se observa en el sistema de células U2OS (Figura 35).



**Figura 35:** Ensayo de genes reporteros utilizando el vector PG13-Luc y co-transfectando los vectores que expresan L11 en dos concentraciones 50ng. o 100ng. y 50ng. de MageA2 (A). Idem anterior con el vector p21-Luc (B). En ambos casos se utiliza el vector Renilla para relativizar la actividad medida en células DKO. Las barras de error indican el D.E.; se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa.

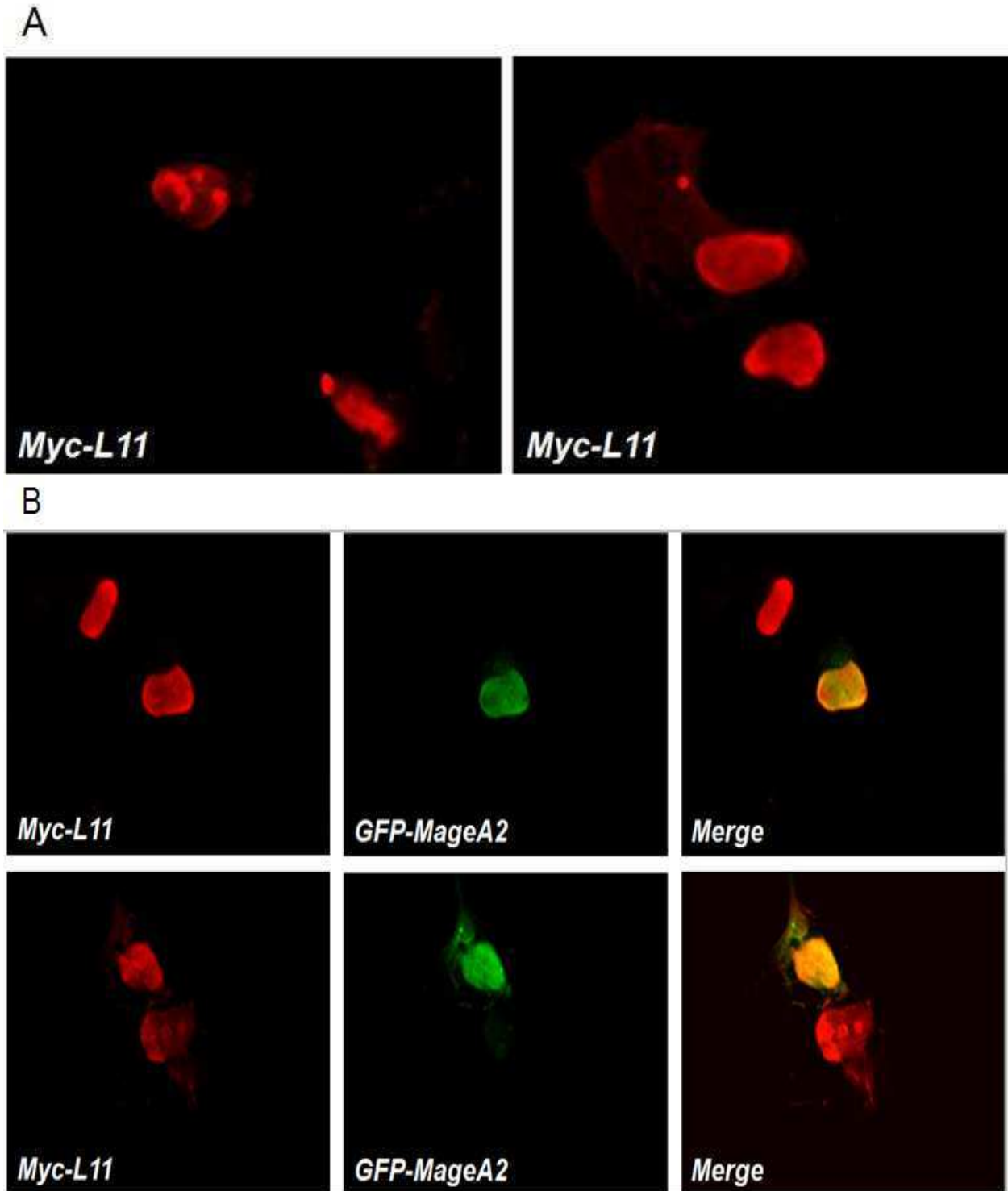
Seguidamente nos preguntamos si el mecanismo por el cual RP L11 es capaz de revertir la inhibición que MageA2 ejerce sobre p53, es por un mecanismo asociado a la inducción de su degradación. Para ello, realizamos ensayos de Western Blot de curvas de tiempo con el agregado de cicloheximida (CHX) para observar desestabilización proteica de MageA2 en ausencia o presencia de RP L11. La CHX es un bloqueante farmacológico de la traducción génica a nivel de los ribosomas 80S que provoca la inhibición de la síntesis proteica *de novo*, de esta manera podemos observar diferencias a nivel de la estabilidad de la proteína MageA2 en presencia de RP L11 (Figura 36.A). Además realizamos una curva con concentraciones crecientes de Myc-L11 para corroborar la traducción o degradación de

MageA2 co-expresada a una concentración constante (Figura 36.B). Los datos indican que no existen diferencias de la estabilidad proteica de MageA2.



**Figura 36:** Western Blot de la curva de tiempo al tratar con 10  $\mu$ M de cicloheximida (CHX), transfectando células HEK 293 con el vector que codifica inmunofluorescencia para Flag-MageA2 en ausencia (-) o en presencia (+) con Myc-L11 (A). Western Blot de células HEK 293 transfectando el vector que expresa Flag-MageA2 y en ausencia o en cantidades crecientes de Myc-L11 (B).

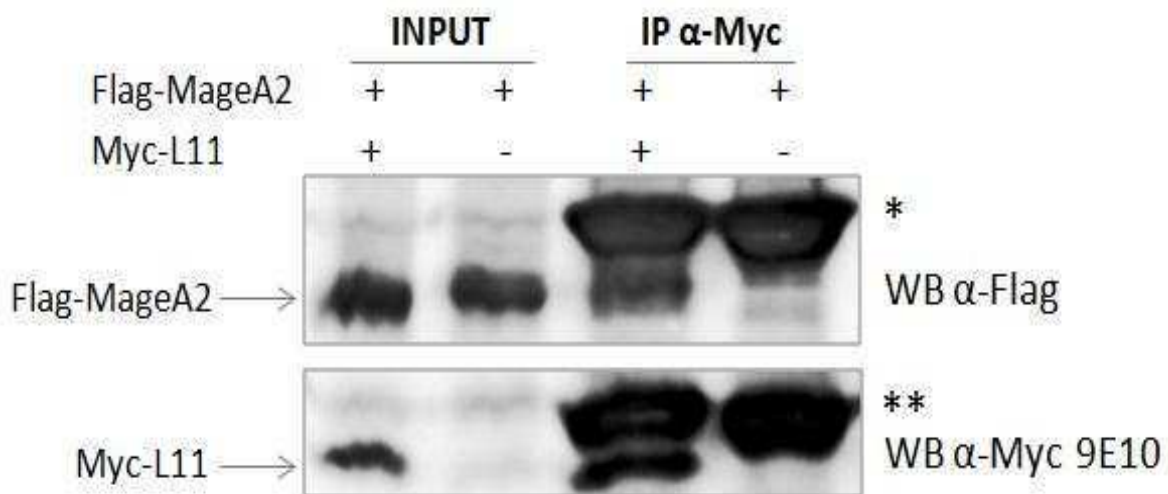
Dado que el mecanismo de represión de MageA2 por parte de RP L11 no es a través de la degradación proteica, nos propusimos evaluar si se encuentra involucrado el mecanismo de "secuestro" de MageA2 a los núcleos mediado por PR L11. Para ello, realizamos ensayos de inmunofluorescencia visualizando la localización celular de MageA2 en presencia de RP L11 (Figura 37).



**Figura 37:** Inmunofluorescencia de la expresión de Myc-L11 (rojo) en células U2OS (A). Inmunofluorescencia de la expresión de Myc-L11 (rojo) y la proteína GFP-MageA2 (verde) en células U2OS, la co-localización se observa como Merge de las imágenes (amarillo) (B).

Es conocido que RP L11 es una proteína nucleolar, nuclear y citoplasmática. Mediante ensayos de inmunofluorescencia pudimos observar que muchas de las células mostraban distintos patrones de localización celular de PR L11 (Figura 37.A), pero que cuando se co-expresa junto con MageA2, su patrón de localización es mayormente nuclear no habiendo una evidente re-localización de MageA2 hacia los nucleólos (Figura 37.B).

Debido a estos datos y al hecho de que aparentemente MageA2 y RP L11 co-localizan en el núcleo realizamos un ensayo de inmunoprecipitación para estudiar la interacción entre ambas proteínas. Nuestros resultados indican que existe asociación entre MageA2 y PR L11 (Figura 38).

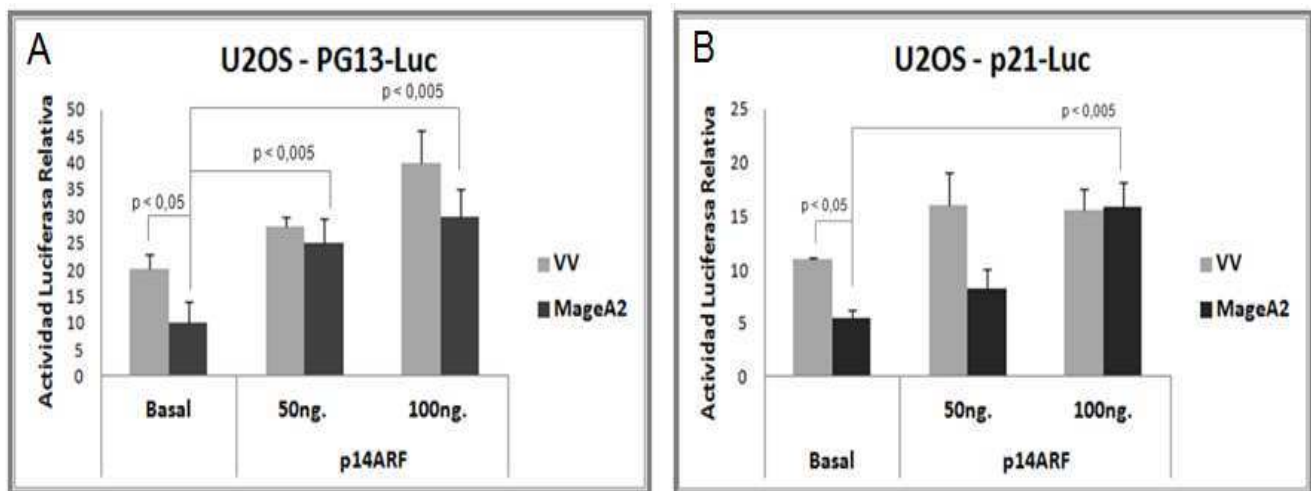


**Figura 38:** Western Blot de la inmunoprecipitación de Myc-L11 en células HEK 293 transfectadas con el vector que expresa Flag-MageA2 en ausencia (-) o en presencia (+) de Myc-L11. Se revela las cadenas pesadas (\*) o livianas (\*\*) de los anticuerpos correspondientes a la IP.

En conjunto nuestros datos sugieren que RP L11 es capaz de revertir la inhibición de MageA2 sobre la actividad transcripcional de p53, y que probablemente se deba a la interacción entre ambas proteínas pero no por un mecanismo de "secuestro" hacia los nucleólos.

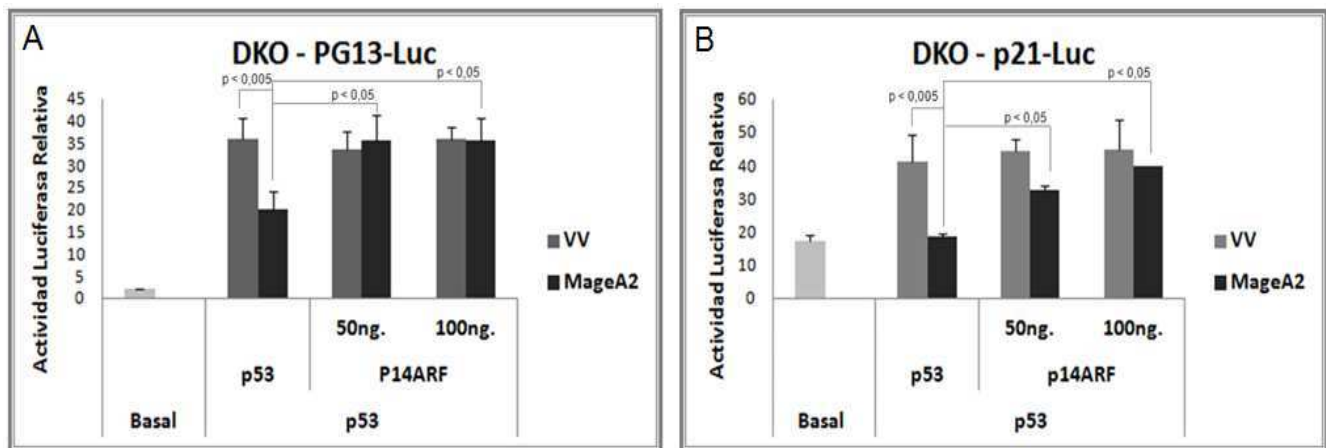
## 7.2. El oncosupresor p14ARF como regulador MageA2

Teniendo en cuenta que el objetivo de esta parte del trabajo es poder evidenciar mecanismos capaces de revertir la inhibición que MageA2 ejerce sobre la actividad de p53, continuamos estudiando sistemas capaces de activar la vía de p53, en este caso a la proteína oncosupresora p14ARF. p14ARF es inducido por E2F1 (Fogal, Gostissa et al. 2000, Eymin, Karayan et al. 2001, Polager and Ginsberg 2008) y clave para la activación de p53. Este supresor tumoral con localización nucleolar es capaz de inhibir la actividad E3 ubiquitina ligasa de Mdm2 y relocalizarlo a los nucléolos (Bernardi, Scaglioni et al. 2004, Ozenne, Eymin et al. 2010). Esta inactivación de Mdm2 lleva a la rápida acumulación y activación de p53. Además, ha sido recientemente reportado que p14ARF es capaz de inducir la respuesta de RP L11 frente a estrés ribosomal, para exacerbar la activación de p53 (Dai, Challagundla et al. 2012). Una vez más mediante la utilización del vector reportero PG13-Luc y p21-Luc, medimos la respuesta de la actividad luciferasa al co-exresar, en este caso, p14ARF y MageA2 (Figura 39). Nuestros datos indican que al igual que lo observado para el caso de RP L11, la expresión de p14ARF es capaz de revertir la represión que MageA2 ejerce sobre p53 en células U2OS con Mdm2 y p53 wt.



**Figura 39:** Ensayo de genes reporteros utilizando el vector PG13-Luc y co- transfectando los vectores que expresan p14ARF en dos concentraciones 50ng. o 100ng. y 50ng. de MageA2 (A). Idem anterior con el vector p21-Luc (B). En ambos casos se utiliza el vector Renilla para relativizar la actividad medida en células U2OS. Las barras de error indican el D.E.; se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa.

Como ya hemos mencionado, el mecanismo de acción de p14ARF para inducir y mantener activado a p53 es mediante la represión del conocido inhibidor Mdm2. Nuevamente, para poder independizarnos de Mdm2 repetimos los ensayos de genes reporteros en las células DKO utilizando ambos vectores reporteros y sobre-expresando al factor p53. Nuestros resultados indican que p14ARF independientemente de la presencia de Mdm2 es capaz de reprimir a MageA2 para que este a su vez no inhiba la actividad de p53 (Figura 40). Como se puede observar, en este sistema, el oncosupresor p14ARF no es capaz de inducir la actividad transcripcional de p53 en ausencia de Mdm2 como sí se observaba en las células U2OS, pero sí es capaz de modular positivamente su actividad en presencia de MageA2.

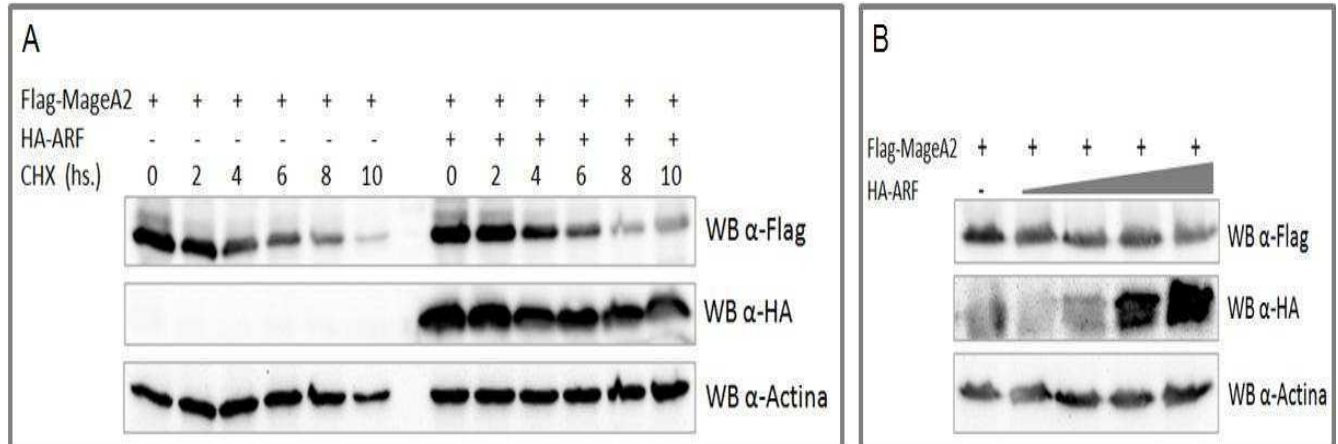


**Figura 40:** Ensayo de genes reporteros utilizando el vector PG13-Luc y co- transfectando los vectores que expresan p14ARF en dos concentraciones 50ng. o 100ng. y 50ng. de MageA2 (A). Idem anterior con el vector p21-Luc (B). En ambos casos se utiliza el vector Renilla para relativizar la actividad medida en células DKO. Las barras de error indican el D.E.; se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa.

Para entender el mecanismo de acción por el cual p14ARF es capaz de regular la represión de p53 mediada por MageA2, realizamos los estudios de estabilidad proteica antes mencionados de MageA2 en presencia o ausencia de p14ARF tratando las células con cicloheximida (Figura 41.A), y además la curva con concentraciones crecientes de p14ARF para corroborar la degradación y/o disminución traduccional de MageA2 (Figura 41.B).



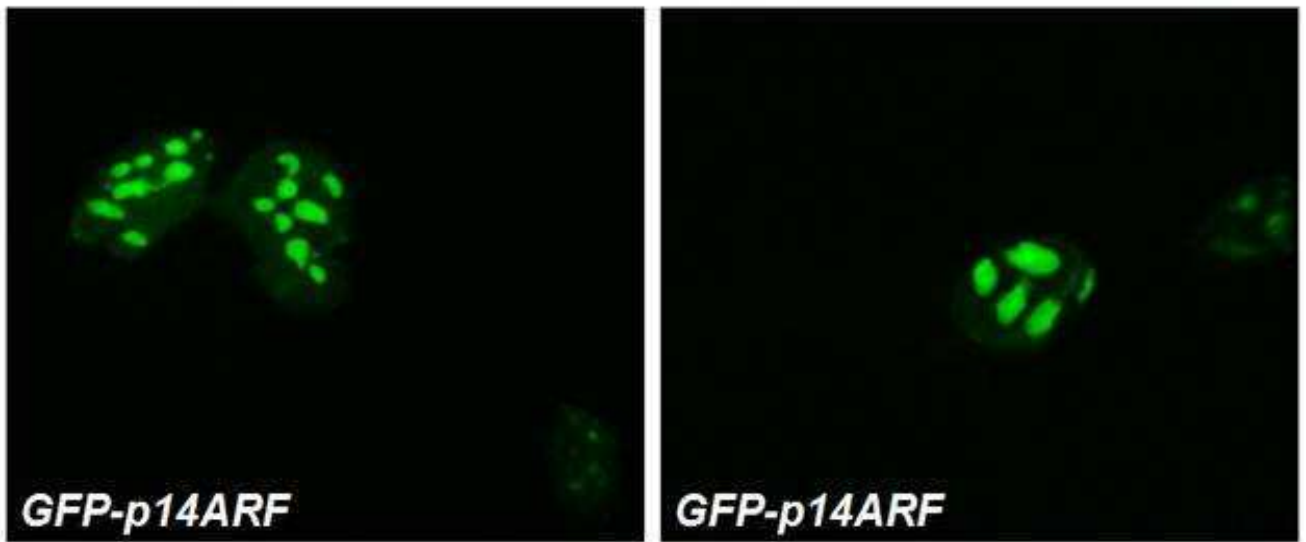
Los datos indican que no existen diferencias en la estabilidad de la proteína MageA2 mediada por p14ARF.



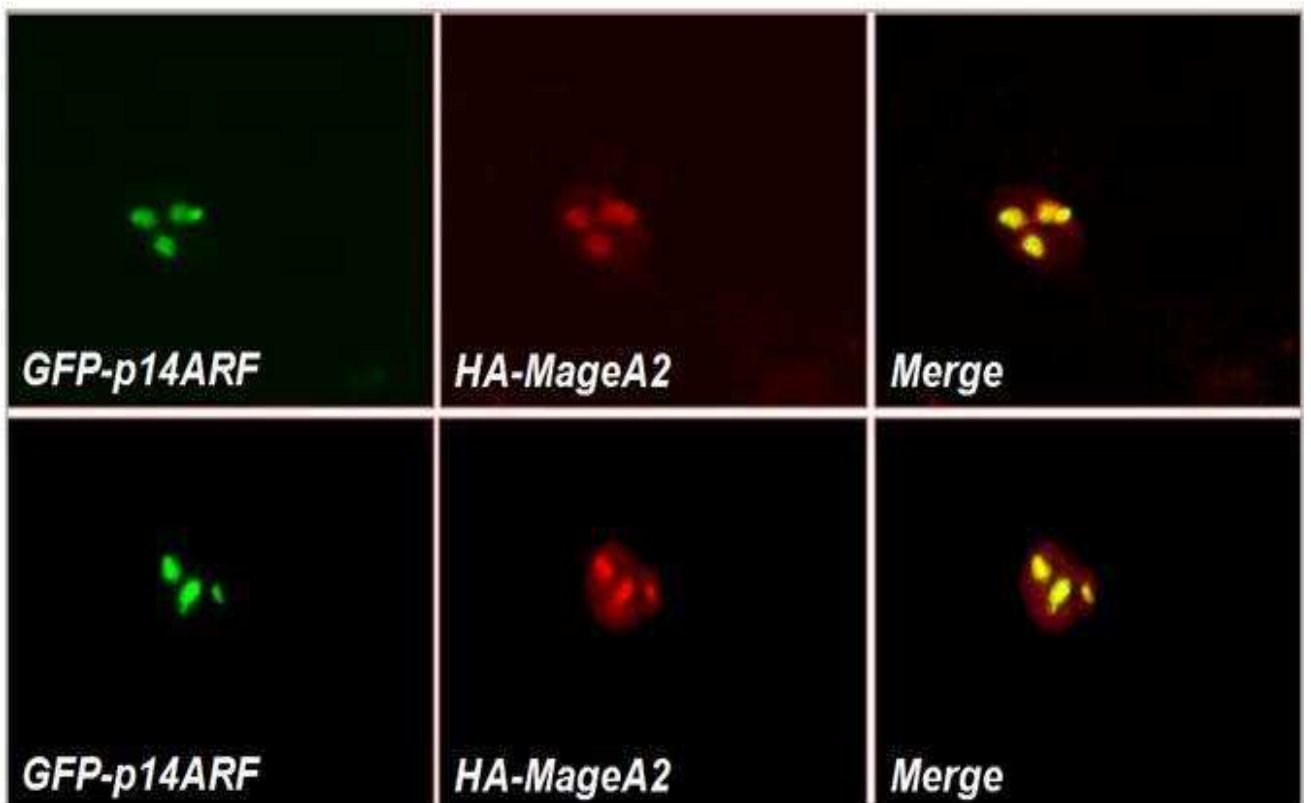
**Figura 41:** Western Blot de la curva de tiempo al tratar con 10  $\mu$ M de cicloheximida (CHX), transfectando células HEK 293 con el vector que codifica inmunofluorescencia para Flag-MageA2 en ausencia (-) o en presencia (+) con HA-ARF (A). Western Blot de células HEK 293 transfectando el vector que expresa Flag-MageA2 y en ausencia o en cantidades crecientes de HA-ARF (B).

Debido a que p14ARF utiliza el mecanismo conocido como “secuestro” de Mdm2 para activar a p53, nos preguntamos si p14ARF funcionaría de la misma manera relocalizando del núcleo a los nucléolos a MageA2. Para ello comenzamos con ensayos de inmunofluorescencia para visualizar la proteína HA-MageA2 co-expresada con GFP-p14ARF. Las imágenes obtenidas del microscopio de fluorescencia indican que p14ARF causa la relocalización de MageA2 a los nucléolos, sugiriendo que el secuestro de MageA2 a estos compartimentos sub-nucleares podría formar parte del mecanismo de p14ARF para impedir la represión de p53, al igual que lo hace con Mdm2 (Figura 42.B).

A

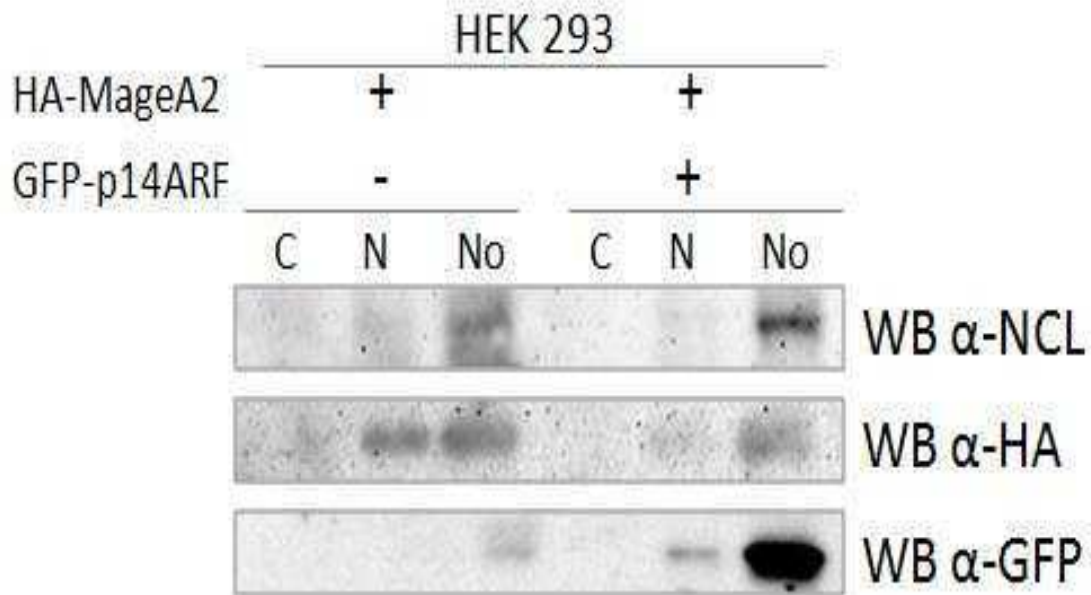


B



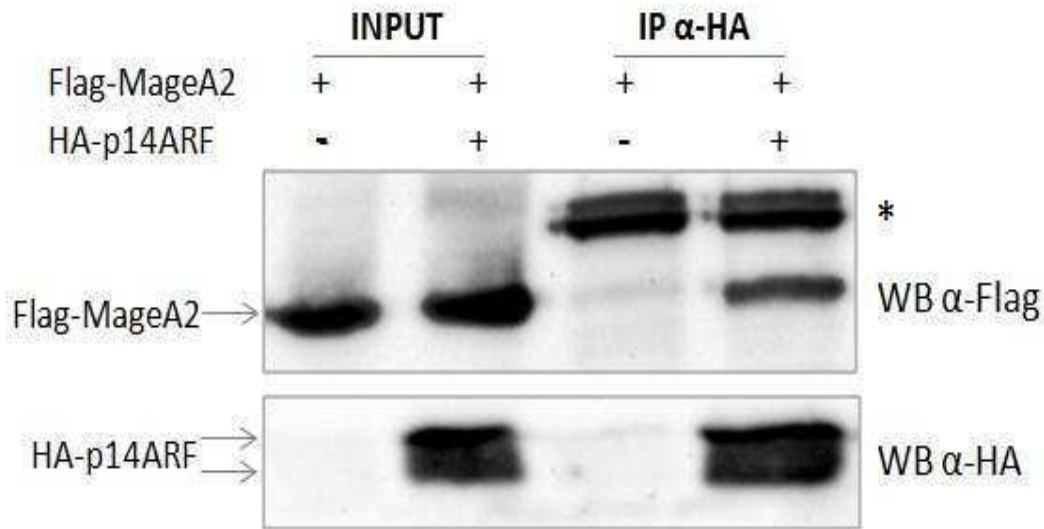
**Figura 42:** Inmunofluorescencia de la expresión de GFP-p14ARF (verde) en células U2OS (A). Inmunofluorescencia de la expresión de GFP-p14ARF (verde) y la proteína HA-MageA2 (rojo) en células U2OS, la co-localización se observa como Merge de las imágenes (amarillo) (B).

Seguidamente para confirmar la co-localización visualizada por inmunofluorescencia realizamos un Western Blot del subfraccionamiento celular correspondiente a extractos proteicos de células HEK 293 transfectadas con el vector que expresa la proteína HA-MageA2 en presencia o ausencia del vector GFP-p14ARF. Se utiliza la proteína Nucleolina como marcador nucleolar. En la figura 43 se observa la relocalización prácticamente total de MageA2 a los nucléolos en presencia de p14ARF.



**Figura 43:** Western Blot del subfraccionamiento celular de células HEK 293 transfectadas con el vector que expresa HA-MageA2 en ausencia (-) o en presencia (+) de GFP-p14ARF. Se revela Nucleolina (NCL) como marcador nucleolar.

Para entender si la relocalización de la proteína MageA2 observada es mediante la interacción proteica entre MageA2 y 14ARF, realizamos un ensayo de inmunoprecipitación mediante el cual se indica una aparentemente asociación entre MageA2 y p14ARF (Figura 44).



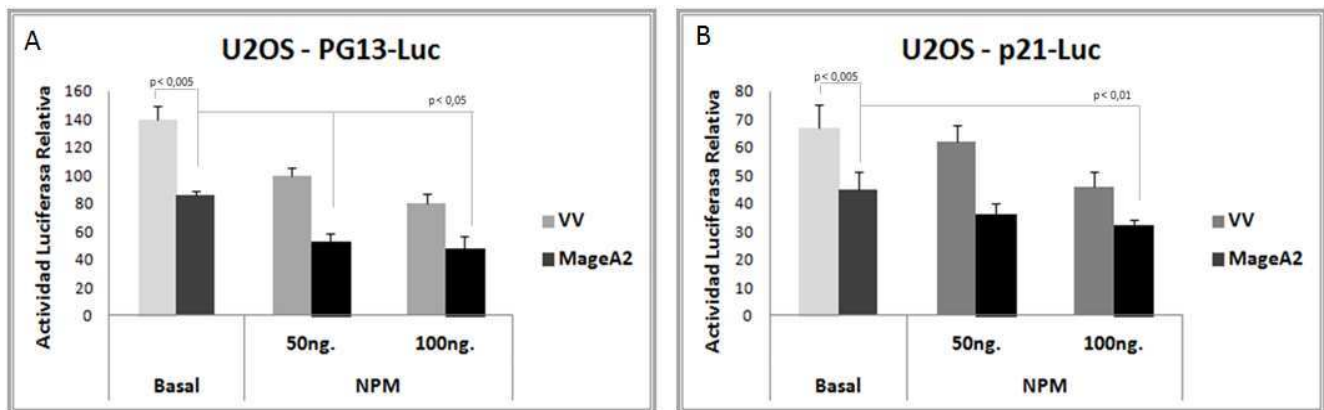
**Figura 44:** Western Blot de la inmunoprecipitación de HA-p14ARF en células HEK 293 transfectadas con el vector que expresa Flag-MageA2 en ausencia (-) o en presencia (+) de HA-p14ARF. Se revela las cadenas pesadas de los anticuerpos correspondientes a la IP (\*).

En conjunto nuestros resultados sugieren que la proteína supresora tumoral p14ARF es capaz de activar al factor p53, mediante la inhibición, no sólo de Mdm2, sino también de MageA2 en células tumorales. El mecanismo de acción es mediante la interacción y reclutamiento hacia los nucleólos de ambas proteínas oncogénicas. Faltaría entender también si p14ARF modula a MageA2 a través de RP L11 o si es independiente de la misma, simplemente siendo un mecanismo sinérgico de ambas proteínas para regular a MageA2.

Estos novedosos datos indican que existen mecanismos celulares capaces inhibir a MageA2. Mediante la interacción con p14ARF y consecuente "secuestro" de la misma al compartimento nucleolar,; y/o por interacción con proteínas como RP L11 en el núcleo dónde probablemente se podría estar inhibiendo la interacción de MageA2 con p53 y/o con las HDACs, liberando de esa manera al factor p53 para ser estabilizado y activado en ambos casos.

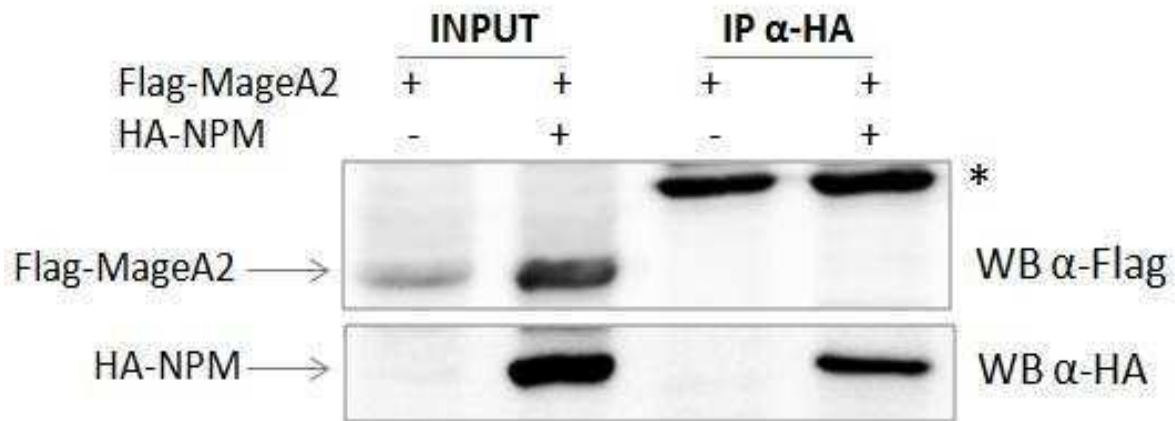
Como habíamos descrito en la introducción, la fosfoproteína Nucleofosmina (NPM) interactúa y compite con p14ARF; y en sobre-expresión, es capaz de retener al supresor tumoral p14ARF en los nucléolos, suprimiendo la activación de p53 dependiente de p14ARF (Korgaonkar, Hagen et al. 2005). Por todo ello, y habiendo demostrado que p14ARF es capaz de suprimir a MageA2, mediante su interacción proteica y relocalización; nos preguntamos si NPM podría ejercer algún efecto sobre MageA2, opuesto al observado por p14ARF, como sucede por Mdm2.

Para ello comenzamos con los ensayos de genes reporteros antes mencionados, co-transfectando NPM con MageA2 en células U2OS. En este caso se observa una disminución sinérgica de la actividad transcripcional de p53 en presencia de MageA2 y NPM (Figura 45). Esta disminución de la actividad transcripcional de p53, no implica necesariamente que ambas proteínas estén actuando de manera conjunta, ya que se observa que NPM es inhibidor del factor p53 independientemente de la presencia de p14ARF (células U2OS son p14ARF<sup>-/-</sup>) y de MageA2 (Figura 45).



**Figura 45:** Ensayo de genes reporteros utilizando el vector PG13-Luc y co-transfectando los vectores que expresan NPM en dos concentraciones 50ng. o 100ng. y 50ng. de MageA2 (A). Idem anterior con el vector p21-Luc (B). En ambos casos se utiliza el vector Renilla para relativizar la actividad medida en células U2OS. Las barras de error indican el D.E.; se utilizó el análisis ANOVA para la determinación de las diferencias estadísticas:  $p < 0,05$  se considera estadísticamente significativa.

Por otro lado, realizamos la inmunoprecipitación de HA-NPM para analizar si hubiera interacción con MageA2 como se observó con p14ARF (Figura 46).



**Figura 46:** Western Blot de la inmunoprecipitación de HA-NPM en células HEK 293 transfectadas con el vector que expresa Flag-MageA2 en ausencia (-) o en presencia (+) de HA-NPM. Se revela las cadenas pesadas de los anticuerpos correspondientes a la IP (\*).

Este ensayo muestra que no existe una interacción directa entre MageA2 y NPM. Por lo que, se indican que existe especificidad de las proteínas capaces de regular a MageA2, y además que p14ARF, RP L11 y NPM a pesar de ser proteínas nucleolares involucradas en mecanismos comunes de respuestas celulares, no todas son capaces de interactuar con MageA2 y/o re-localizarla al compartimento nucleolar.

# Discusión

Las proteínas MAGE-I se expresan en una gran variedad de tumores y por ello, son consideradas antígenos prometedores para producir vacunas anti-tumorales. Como ya hemos mencionado en la introducción, la expresión de genes *mage-I* es temprana en la transformación tumoral y su expresión correlaciona con un pronóstico pobre en pacientes no tratados (ver sección I-2.1).

En este trabajo de tesis caracterizamos la proteína MageB2, demostrando que MageB2 localiza en diferentes compartimentos celulares comparada con MageA2 y que, además, cumple una función biológica diferente; siendo MageB2 un factor pro-proliferativo inductor de la progresión del ciclo celular que estimula la vía de E2F, mientras que MageA2 es anti-apoptótico inhibiendo la vía del supresor tumoral p53 (ver sección I-2.1.1). Estos novedosos datos sugieren que a pesar de la alta homología de secuencias que se conserva dentro de esta gran familia multigénica, en este caso entre MageA2 y MageB2, sus funciones no son redundantes (ver sección I-2.1.1/2.1.2). Es importante mencionar que ambas vías son capaces de generar resistencia a drogas quimioterapéuticas, sugiriendo que cada una aporta distintos mecanismos celulares y que, probablemente, la co-expresión de más de un gen *mage-I* y su consecuente desbalance de otras proteínas, contribuyen a su potencial oncogénico. Cabe destacar, que este tipo de estrategia, en la que más de una vía esencial de la regulación del ciclo celular es bloqueada, ha sido ampliamente estudiada en modelos similares de infecciones virales cuya función bloqueante conjunta favorece la transformación tumoral de células. Este efecto entre MageB2 y MageA2 en su conjunto, podría recapitular el mecanismo de virus oncogénicos a ADN como SV40, adenovirus y papilomavirus, que basan su actividad oncogénica en la inhibición simultánea de las vías de p53 y pRb (ver sección I-1). Contrariamente a lo que se encuentra reportado sobre las proteínas MAGE-II, las cuales se expresan ubicuamente en células normales, manteniendo un control regulado de la actividad de los factores E2F y p53, y mayormente evitando la progresión del ciclo celular (ver sección I-2.2).

Por otro lado se comparó si la localización celular de los MAGE-I es lo que determina sus funciones biológicas, para lo que se realizaron distintas construcciones de MageA4 o MageB2. Nuestros resultados indicaron: por un lado, que a pesar de tener igual secuencias MHD, la relocalización de MageA4 (principalmente citoplasmático) en los



núcleos, no tiene efecto inhibitorio sobre p53 como lo hace MageA2, sugiriendo la especificidad de estas proteínas. Por otro lado, la construcción  $\Delta$ NoLS-MageB2 estudiada, demostró que MageB2 a pesar de no localizar en los nucléolos es capaz de inducir al factor E2F1 y, además, es capaz de asociarse a HDAC1 (datos no mostrados). En conjunto, nuestros datos correlacionan con la idea de que, a pesar de la alta homología conservada en las secuencias y más aún en sus MHD, existe especificidad de las funciones de estas proteínas MAGE-I, aquí estudiadas, y sus funciones no serían redundantes; en este sentido, comparando a MageA2 con MageA4 o MageA2 con MageB2.

Más aún, el hecho de que MageB2 localice en los nucléolos y sea capaz de interactuar con proteínas nucleolares y ribosomales, nos da indicios de que pueda estar regulando posibles mecanismos de defensa ante la inducción de arresto celular o apoptosis dependiente de estrés ribosomal (ver sección R-3). Se encuentra reportado que ante el estrés ribosomal inducido mediante el tratamiento de bajas dosis de ActD (un inhibidor de la síntesis de ARN), se produce la relocalización de las proteínas ribosomales del nucléolo al núcleo, inhibiendo a Mdm2 y activando la vía de p53 (ver sección ). Algunos ensayos preliminares no mostrados en este trabajo, nos dieron indicios de que MageB2, a pesar de relocalizar de la misma manera ante el tratamiento con ActD, es capaz de promover la progresión del ciclo celular, manteniendo la vía de E2F activada; y probablemente, evitando que las proteínas ribosomales interactúen e inhiban a MageA2, para que de esta manera se logre la activación de la vía de p53. Estos resultados nos dan un amplio panorama para seguir investigando la posible cooperación entre estas dos proteínas MAGE-I, siendo el estrés ribosomal uno de los principales mecanismos para profundizar su estudio.

Como se describe aquí, MageA2 y MageB2 a pesar de poseer diferentes mecanismo de acción que lleven a la progresión del ciclo celular, comparten la misma habilidad de asociarse a HDACs para llevar su efecto regulatorio (ver sección R-2). De hecho, como hemos mencionado en la introducción, existen otras proteínas MAGE-I capaces de relacionarse con HDACs y regular ciertos factores de transcripción, así como lo hacen

muchos otros oncogenes (ver sección I-2.1.1). Es por ello, que la inhibición de las HDACs mediante el tratamiento con TSA puede ser una efectiva estrategia para inhibir más de una proteína MAGE-I y evitar sus actividades biológicas dependientes de las HDACs (ver sección R-2).

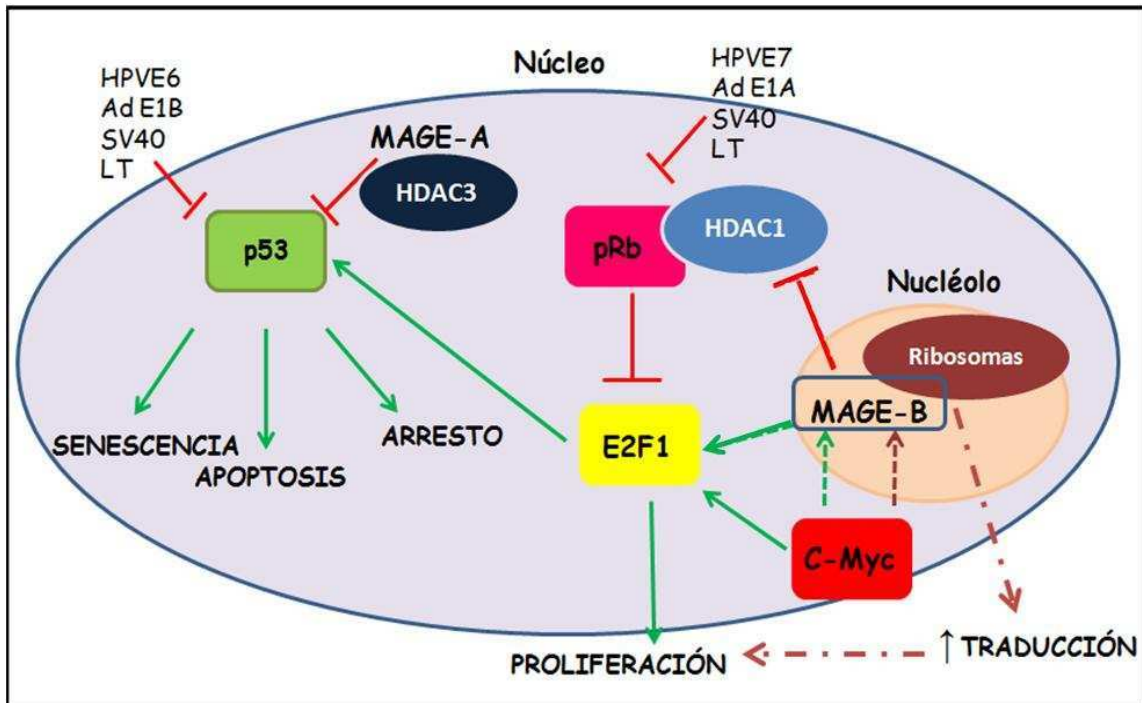
Además, reportamos por primera vez la asociación de una proteína MAGE-I en la biogénesis ribosomal, por la acción de MageB2 en la transcripción de ARNr, probablemente a través de inducción de E2F (ver sección R-4.1). Hemos demostrado que la presencia de MageB2 induce la biogénesis ribosomal, y además de forma sinérgica potencia esta función de c-Myc. Otro dato preliminar no mostrado, que nos llamó particularmente la atención, fue que c-Myc era capaz de relocalizar al  $\Delta$ NoLS-MageB2 del núcleo a los nucléolos; y, que además, al mutar el sitio canónico de c-Myc en el promotor clonado de MageB2, se continuaba observando inducción de la actividad luciferasa similar al obtenido por el promotor wt.

Para dilucidar estos efectos de c-Myc sobre MageB2, hemos intentado indagar la existencia de esta posible relación c-Myc/MageB2, tratando de generar líneas estables con el sistema ER-Myc (Eilers, Picard et al. 1989). Este sistema permite mantener a c-Myc citoplasmático e inactivo por estar fusionado con el receptor de estrógenos que se encuentra modificado para responder solamente a 4-hidroxitamoxifeno (4OHT), cuyo tratamiento relocaliza al factor al núcleo y consecuentemente induce su actividad transcripcional. Este sistema nos hubiera facilitado medir la actividad de biogénesis ribosomal mediada por MageB2 y, además, analizar la expresión de ARNm de MageB2 inducida por c-Myc para corroborar los datos obtenidos de los ensayos de genes reporteros con pMageB2-Luc. A pesar de nuestros esfuerzos, no logramos obtener el sistema, debido a que ER-Myc se localizaba directamente en núcleo y el sistema estaba siempre inducido.

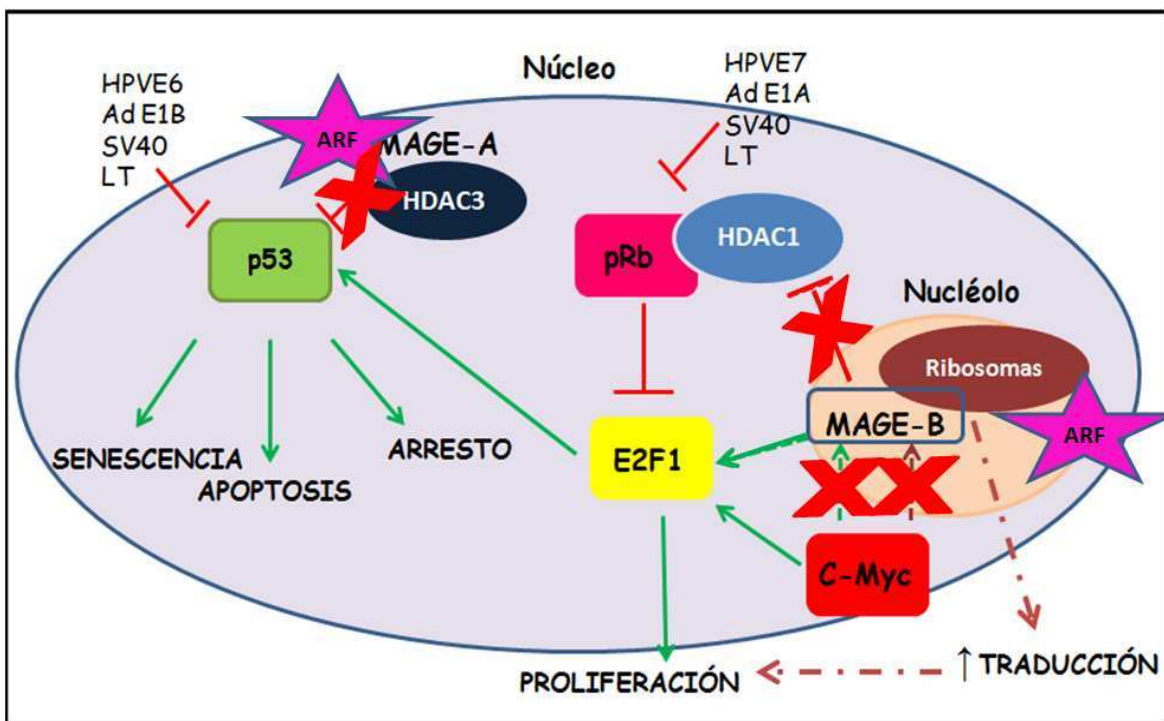
Estos datos son importantes a la hora de pensar en algún mecanismo en común para poder inhibir a las proteínas MAGE-I. Por ello es que conociendo el mecanismo de acción de MageA2, nos propusimos encontrar posibles reguladores de esta proteína que estuvieran involucrados en la vía de p53. Así fue que dimos con la proteína p14ARF, que mediante la interacción con MageA2 y/o su reclutamiento hacia los nucléolos, es capaz de revertir el efecto inhibitorio que MageA2 ejerce sobre p53 de manera independiente a Mdm2 (ver sección R-7.2). No sólo nos interesó esta proteína por restituir la actividad transcripcional de p53, sino que también p14ARF es un conocido inductor de la respuesta a estrés ribotóxico, induciendo a proteínas ribosomales a relocalizar hacia el núcleo (como RP L11, que es también inhibidor de MageA2); y, porque además, es un inhibidor de c-Myc. En conjunto, todo esto nos lleva a pensar que, mediante p14ARF, se podría inhibir a MageA2 directamente e indirectamente a través de RP L11; y suprimir la inducción en la progresión del ciclo celular mediada por MageB2 tanto a nivel de la biogénesis ribosomal como a nivel de la activación de E2F, mediante la inhibición del factor c-Myc (Datta, Nag et al. 2004) y de Mdm2 (por ser estabilizador de E2F) respectivamente.

Este proceso de inhibición por contacto directo o través de otras proteínas sería similar a lo recientemente reportado por la acción de algunos miRNAs que son supresores de los MAGE-I; más específicamente el miR-34a como supresor de algunos Mage-A restituyendo la actividad de p53 (Weeraratne, Amani et al. 2011). De hecho, se reportó un proceso de auto-regulación positiva entre miR-34a y p53, en el que la represión de los Mage-A genera un aumento de p53 que activa y aumenta la transcripción de más miR-34a. Este mecanismo se podría pensar para p14ARF ya que también es activador de p53 e inhibidor de MageA2, y además inhibe a E2F mediante la represión de Mdm2.

En conjunto, con todos los datos aquí proporcionados, proponemos el siguiente modelo de acción de cooperación entre distintos MAGE-I como potencial oncogénico:



Modelo propuesto de cooperación entre MageA2 y MageB2, a través de diferentes vías oncogénicas. Las flechas punteadas indican posibles mecanismos de acción.



Modelo propuesto para la inhibición conjunta de MageA2 y MageB2 a través del oncosupresor p14ARF, como potencial terapia antitumoral.

# Conclusiones

---

1. A pesar de la alta conservación de identidad entre las proteínas MageA2 y MageB2 se observa que:

- La localización celular es diferente:
  - MageB2 localiza en citoplasma, núcleo y nucléolo
  - MageA2 en principalmente nuclear
- Formación de complejos:
  - MageB2 no interactúa con p53
  - MageB2 induce al factor E2F mediante la asociación con las HDACs
  - MageA2 reprime al factor p53 mediante la asociación de complejos con HDACs
- No hay redundancia funcional:
  - MageB2 induce proliferación en forma independiente a p53
  - MageB2 activa la vía de los factores pro-proliferativos E2Fs e inducción de la biogénesis ribosomal
  - MageA2 genera resistencia a la apoptosis inducida por drogas quimioterapéuticas a través de la vía de p53

2. Existen mecanismos por los cuales se puede inhibir a MageA2 y probablemente a otros miembros MAGE-I:

- p14ARF y RP L11 son capaces de restituir la actividad de p53 en presenciade MageA2

**Existe una cooperación entre los miembros de la familia de genes MAGE-I: mientras MageB2 es capaz de inducir la proliferación, MageA2 es capaz de inhibir a los factores supresores tumorales activados por los mismos. Esta cooperación entre MageB2 y MageA2 favorece la progresión del ciclo celular y anula los procesos pro-apoptóticos.**

# Bibliografía

- Adams, J. M., A. W. Harris, C. A. Pinkert, L. M. Corcoran, W. S. Alexander, S. Cory, R. D. Palmiter and R. L. Brinster (1985). "The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice." *Nature* **318**(6046): 533-538.
- Al-Kuraya, K., H. Novotny, P. Bavi, A. K. Siraj, S. Uddin, A. Ezzat, N. A. Sanea, F. Al-Dayel, H. Al-Mana, S. S. Sheikh, M. Mirlacher, C. Tapia, R. Simon, G. Sauter, L. Terracciano and L. Tornillo (2007). "HER2, TOP2A, CCND1, EGFR and C-MYC oncogene amplification in colorectal cancer." *J Clin Pathol* **60**(7): 768-772.
- Albertson, D. G., C. Collins, F. McCormick and J. W. Gray (2003). "Chromosome aberrations in solid tumors." *Nat Genet* **34**(4): 369-376.
- Amati, B., M. W. Brooks, N. Levy, T. D. Littlewood, G. I. Evan and H. Land (1993). "Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max." *Cell* **72**(2): 233-245.
- Armelin, H. A., M. C. Armelin, K. Kelly, T. Stewart, P. Leder, B. H. Cochran and C. D. Stiles (1984). "Functional role for c-myc in mitogenic response to platelet-derived growth factor." *Nature* **310**(5979): 655-660.
- Artamonova, I. and M. S. Gelfand (2004). "Evolution of the exon-intron structure and alternative splicing of the MAGE-A family of cancer/testis antigens." *J Mol Evol* **59**(5): 620-631.
- Atanackovic, D., Y. Hildebrandt, A. Jadczyk, Y. Cao, T. Luetkens, S. Meyer, S. Kobold, K. Bartels, C. Pabst, N. Lajmi, M. Gordic, T. Stahl, A. R. Zander, C. Bokemeyer and N. Kroger (2010). "Cancer-testis antigens MAGE-C1/CT7 and MAGE-A3 promote the survival of multiple myeloma cells." *Haematologica* **95**(5): 785-793.
- Bai, S., B. He and E. M. Wilson (2005). "Melanoma antigen gene protein MAGE-11 regulates androgen receptor function by modulating the interdomain interaction." *Mol Cell Biol* **25**(4): 1238-1257.
- Bai, S. and E. M. Wilson (2008). "Epidermal-growth-factor-dependent phosphorylation and ubiquitinylation of MAGE-11 regulates its interaction with the androgen receptor." *Mol Cell Biol* **28**(6): 1947-1963.
- Baker, S. J., E. R. Fearon, J. M. Nigro, S. R. Hamilton, A. C. Preisinger, J. M. Jessup, P. vanTuinen, D. H. Ledbetter, D. F. Barker, Y. Nakamura, R. White and B. Vogelstein (1989). "Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas." *Science* **244**(4901): 217-221.
- Barak, Y., T. Juven, R. Haffner and M. Oren (1993). "mdm2 expression is induced by wild type p53 activity." *EMBO J* **12**(2): 461-468.
- Barker, P. A. and A. Salehi (2002). "The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease." *J Neurosci Res* **67**(6): 705-712.
- Bartkova, J., N. Rezaei, M. Liontos, P. Karakaidos, D. Kletsas, N. Issaeva, L. V. Vassiliou, E. Kolettas, K. Niforou, V. C. Zoumpourlis, M. Takaoka, H. Nakagawa, F. Tort, K. Fugger, F. Johansson, M. Sehested, C. L. Andersen, L. Dyrskjot, T. Orntoft, J. Lukas, C. Kittas, T. Helleday, T. D. Halazonetis, J. Bartek and V. G. Gorgoulis (2006). "Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints." *Nature* **444**(7119): 633-637.
- Basu, A., N. E. Bodycombe, J. H. Cheah, E. V. Price, K. Liu, G. I. Schaefer, R. Y. Ebright, M. L. Stewart, D. Ito, S. Wang, A. L. Bracha, T. Liefeld, M. Wawer, J. C. Gilbert, A. J. Wilson, N. Stransky, G. V. Kryukov, V. Dancik, J. Barretina, L. A. Garraway, C. S. Hon, B. Munoz, J. A. Bittker, B. R. Stockwell, D. Khabele, A. M. Stern, P. A. Clemons, A. F. Shamji and S. L. Schreiber (2013). "An interactive resource to identify cancer genetic and lineage dependencies targeted by small molecules." *Cell* **154**(5): 1151-1161.
- Ben-Porath, I. and R. A. Weinberg (2005). "The signals and pathways activating cellular senescence." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(5): 961-976.
- Bernardi, R. and P. P. Pandolfi (2003). "Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death." *Oncogene* **22**(56): 9048-9057.
- Bernardi, R. and P. P. Pandolfi (2007). "Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(12): 1006-1016.
- Bernardi, R., A. Papa and P. P. Pandolfi (2008). "Regulation of apoptosis by PML and the PML-NBs." *Oncogene* **27**(48): 6299-6312.
- Bernardi, R., P. P. Scaglioni, S. Bergmann, H. F. Horn, K. H. Vousden and P. P. Pandolfi (2004). "PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus." *Nat Cell Biol* **6**(7): 665-672.
- Bernstein, B. E., A. Meissner and E. S. Lander (2007). "The mammalian epigenome." *Cell* **128**(4): 669-681.

- Beroukhi, R., C. H. Mermel, D. Porter, G. Wei, S. Raychaudhuri, J. Donovan, J. Barretina, J. S. Boehm, J. Dobson, M. Urashima, K. T. Mc Henry, R. M. Pinchback, A. H. Ligon, Y. J. Cho, L. Haery, H. Greulich, M. Reich, W. Winckler, M. S. Lawrence, B. A. Weir, K. E. Tanaka, D. Y. Chiang, A. J. Bass, A. Loo, C. Hoffman, J. Prensner, T. Liefeld, Q. Gao, D. Yecies, S. Signoretti, E. Maher, F. J. Kaye, H. Sasaki, J. E. Tepper, J. A. Fletcher, J. Taberero, J. Baselga, M. S. Tsao, F. Demichelis, M. A. Rubin, P. A. Janne, M. J. Daly, C. Nucera, R. L. Levine, B. L. Ebert, S. Gabriel, A. K. Rustgi, C. R. Antonescu, M. Ladanyi, A. Letai, L. A. Garraway, M. Loda, D. G. Beer, L. D. True, A. Okamoto, S. L. Pomeroy, S. Singer, T. R. Golub, E. S. Lander, G. Getz, W. R. Sellers and M. Meyerson (2010). "The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers." Nature **463**(7283): 899-905.
- Bertrand, M. J., R. S. Kenchappa, D. Andrieu, M. Leclercq-Smekens, H. N. Nguyen, B. D. Carter, F. Muscatelli, P. A. Barker and O. De Backer (2008). "NRAGE, a p75NTR adaptor protein, is required for developmental apoptosis in vivo." Cell Death Differ **15**(12): 1921-1929.
- Bertwistle, D., M. Sugimoto and C. J. Sherr (2004). "Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23." Mol Cell Biol **24**(3): 985-996.
- Bhan, S., S. S. Negi, C. Shao, C. A. Glazer, A. Chuang, D. A. Gaykalova, W. Sun, D. Sidransky, P. K. Ha and J. A. Califano (2011). "BORIS binding to the promoters of cancer testis antigens, MAGEA2, MAGEA3, and MAGEA4, is associated with their transcriptional activation in lung cancer." Clin Cancer Res **17**(13): 4267-4276.
- Bhat, K. P., K. Itahana, A. Jin and Y. Zhang (2004). "Essential role of ribosomal protein L11 in mediating growth inhibition-induced p53 activation." EMBO J **23**(12): 2402-2412.
- Bhatia, N., B. Yang, T. Z. Xiao, N. Peters, M. F. Hoffmann and B. J. Longley (2011). "Identification of novel small molecules that inhibit protein-protein interactions between MAGE and KAP-1." Arch Biochem Biophys **508**(2): 217-221.
- Bird, A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." Genes Dev **16**(1): 6-21.
- Bischof, O., O. Kirsh, M. Pearson, K. Itahana, P. G. Pelicci and A. Dejean (2002). "Deconstructing PML-induced premature senescence." EMBO J **21**(13): 3358-3369.
- Blagosklonny, M. V. (1997). "Loss of function and p53 protein stabilization." Oncogene **15**(16): 1889-1893.
- Bodmer, W. F. (1999). "1998 Runme Shaw Memorial Lecture: somatic evolution of cancer." Ann Acad Med Singapore **28**(3): 323-329.
- Bonetta, L. (2005). "Going on a cancer gene hunt." Cell **123**(5): 735-737.
- Bonin, G., C. Scamps, C. Turc-Carel and M. Lipinski (1993). "Chimeric EWS-FLI1 transcript in a Ewing cell line with a complex t(11;22;14) translocation." Cancer Res **53**(16): 3655-3657.
- Bos, J. L. (1989). "ras oncogenes in human cancer: a review." Cancer Res **49**(17): 4682-4689.
- Bozic, I., T. Antal, H. Ohtsuki, H. Carter, D. Kim, S. Chen, R. Karchin, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and M. A. Nowak (2010). "Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(43): 18545-18550.
- Braithwaite, A. W., G. Del Sal and X. Lu (2006). "Some p53-binding proteins that can function as arbiters of life and death." Cell Death Differ **13**(6): 984-993.
- Breitbach, C. J., J. Burke, D. Jonker, J. Stephenson, A. R. Haas, L. Q. Chow, J. Nieva, T. H. Hwang, A. Moon, R. Patt, A. Pelusio, F. Le Boeuf, J. Burns, L. Evgin, N. De Silva, S. Cvancic, T. Robertson, J. E. Je, Y. S. Lee, K. Parato, J. S. Diallo, A. Fenster, M. Daneshmand, J. C. Bell and D. H. Kirn (2011). "Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans." Nature **477**(7362): 99-102.
- Brivanlou, A. H. and J. E. Darnell, Jr. (2002). "Signal transduction and the control of gene expression." Science **295**(5556): 813-818.
- Bronfman, F. C., M. Tcherpakov, T. M. Jovin and M. Fainzilber (2003). "Ligand-induced internalization of the p75 neurotrophin receptor: a slow route to the signaling endosome." J Neurosci **23**(8): 3209-3220.
- Brown, C. J., S. Lain, C. S. Verma, A. R. Fersht and D. P. Lane (2009). "Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway." Nat Rev Cancer **9**(12): 862-873.
- Budanov, A. V., J. H. Lee and M. Karin (2010). "Stressin' Sestrins take an aging fight." EMBO Mol Med **2**(10): 388-400.



- Bunz, F., A. Dutriaux, C. Lengauer, T. Waldman, S. Zhou, J. P. Brown, J. M. Sedivy, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1998). "Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage." Science **282**(5393): 1497-1501.
- Burmeister, T. (2001). "Oncogenic retroviruses in animals and humans." Rev Med Virol **11**(6): 369-380.
- Caballero, O. L. and Y. T. Chen (2009). "Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy." Cancer Sci **100**(11): 2014-2021.
- Cam, H. and B. D. Dynlacht (2003). "Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication." Cancer Cell **3**(4): 311-316.
- Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(9): 729-740.
- Cilensek, Z. M., F. Yehiely, R. K. Kular and L. P. Deiss (2002). "A member of the GAGE family of tumor antigens is an anti-apoptotic gene that confers resistance to Fas/CD95/APO-1, Interferon-gamma, taxol and gamma-irradiation." Cancer Biol Ther **1**(4): 380-387.
- Clark, P. A., S. Llanos and G. Peters (2002). "Multiple interacting domains contribute to p14ARF mediated inhibition of MDM2." Oncogene **21**(29): 4498-4507.
- Collins, C. J. and J. M. Sedivy (2003). "Involvement of the INK4a/Arf gene locus in senescence." Aging Cell **2**(3): 145-150.
- Challagundla, K. B., X. X. Sun, X. Zhang, T. DeVine, Q. Zhang, R. C. Sears and M. S. Dai (2011). "Ribosomal protein L11 recruits miR-24/miRISC to repress c-Myc expression in response to ribosomal stress." Mol Cell Biol **31**(19): 4007-4021.
- Chellappan, S. P., S. Hiebert, M. Mudryj, J. M. Horowitz and J. R. Nevins (1991). "The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein." Cell **65**(6): 1053-1061.
- Chen, D., J. Shan, W. G. Zhu, J. Qin and W. Gu (2010). "Transcription-independent ARF regulation in oncogenic stress-mediated p53 responses." Nature **464**(7288): 624-627.
- Chen, D., Z. Zhang, M. Li, W. Wang, Y. Li, E. R. Rayburn, D. L. Hill, H. Wang and R. Zhang (2007). "Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function." Oncogene **26**(35): 5029-5037.
- Chen, L., V. Marechal, J. Moreau, A. J. Levine and J. Chen (1997). "Proteolytic cleavage of the mdm2 oncoprotein during apoptosis." J Biol Chem **272**(36): 22966-22973.
- Cheng, S., W. Liu, M. Mercado, S. Ezzat and S. L. Asa (2009). "Expression of the melanoma-associated antigen is associated with progression of human thyroid cancer." Endocr Relat Cancer **16**(2): 455-466.
- Chesi, M., D. F. Robbiani, M. Sebag, W. J. Chng, M. Affer, R. Tiedemann, R. Valdez, S. E. Palmer, S. S. Haas, A. K. Stewart, R. Fonseca, R. Kremer, G. Cattoretti and P. L. Bergsagel (2008). "AID-dependent activation of a MYC transgene induces multiple myeloma in a conditional mouse model of post-germinal center malignancies." Cancer Cell **13**(2): 167-180.
- Chin, L. and J. W. Gray (2008). "Translating insights from the cancer genome into clinical practice." Nature **452**(7187): 553-563.
- Chinnam, M. and D. W. Goodrich (2011). "RB1, development, and cancer." Curr Top Dev Biol **94**: 129-169.
- Chomez, P., O. De Backer, M. Bertrand, E. De Plaen, T. Boon and S. Lucas (2001). "An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family." Cancer Res **61**(14): 5544-5551.
- Chuaire-Noack, L., M. C. Sanchez-Corredor and S. Ramirez-Clavijo (2008). "[P53 and its role in the ovarian surface epithelium. A review]." Invest Clin **49**(4): 561-593.
- Chudnovsky, Y., P. A. Khavari and A. E. Adams (2005). "Melanoma genetics and the development of rational therapeutics." J Clin Invest **115**(4): 813-824.
- D'Orazi, G., B. Cecchinelli, T. Bruno, I. Manni, Y. Higashimoto, S. Saito, M. Gostissa, S. Coen, A. Marchetti, G. Del Sal, G. Piaggio, M. Fanciulli, E. Appella and S. Soddu (2002). "Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis." Nat. Cell Biol. **4**: 11-19.
- Dai, M. S., K. B. Challagundla, X. X. Sun, L. R. Palam, S. X. Zeng, R. C. Wek and H. Lu (2012). "Physical and functional interaction between ribosomal protein L11 and the tumor suppressor ARF." J Biol Chem **287**(21): 17120-17129.
- Dai, M. S. and H. Lu (2004). "Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5." J Biol Chem **279**(43): 44475-44482.

- Dai, M. S., D. Shi, Y. Jin, X. X. Sun, Y. Zhang, S. R. Grossman and H. Lu (2006). "Regulation of the MDM2-p53 pathway by ribosomal protein L11 involves a post-ubiquitination mechanism." J Biol Chem **281**(34): 24304-24313.
- Dai, M. S., X. X. Sun and H. Lu (2010). "Ribosomal protein L11 associates with c-Myc at 5 S rRNA and tRNA genes and regulates their expression." J Biol Chem **285**(17): 12587-12594.
- Dai, M. S., S. X. Zeng, Y. Jin, X. X. Sun, L. David and H. Lu (2004). "Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition." Mol Cell Biol **24**(17): 7654-7668.
- Dang, C. V. (2012). "MYC on the path to cancer." Cell **149**(1): 22-35.
- Dang, C. V., F. Li and L. A. Lee (2005). "Could MYC induction of mitochondrial biogenesis be linked to ROS production and genomic instability?" Cell Cycle **4**(11): 1465-1466.
- Datta, A., A. Nag, W. Pan, N. Hay, A. L. Gartel, O. Colamonici, Y. Mori and P. Raychaudhuri (2004). "Myc-ARF (alternate reading frame) interaction inhibits the functions of Myc." J Biol Chem **279**(35): 36698-36707.
- De Backer, O., A. M. Verheyden, B. Martin, D. Godelaine, E. De Plaen, R. Brasseur, P. Avner and T. Boon (1995). "Structure, chromosomal location, and expression pattern of three mouse genes homologous to the human MAGE genes." Genomics **28**(1): 74-83.
- De Plaen, E., K. Arden, C. Traversari, J. J. Gaforio, J. P. Szikora, C. De Smet, F. Brasseur, P. van der Bruggen, B. Lethe, C. Lurquin and et al. (1994). "Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family." Immunogenetics **40**(5): 360-369.
- De Smet, C., O. De Backer, I. Faraoni, C. Lurquin, F. Brasseur and T. Boon (1996). "The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(14): 7149-7153.
- De Smet, C., A. Lorient and T. Boon (2004). "Promoter-dependent mechanism leading to selective hypomethylation within the 5' region of gene MAGE-A1 in tumor cells." Mol Cell Biol **24**(11): 4781-4790.
- De Smet, C., C. Lurquin, B. Lethe, V. Martelange and T. Boon (1999). "DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter." Mol Cell Biol **19**(11): 7327-7335.
- DeGregori, J. (2002). "The genetics of the E2F family of transcription factors: shared functions and unique roles." Biochim Biophys Acta **1602**(2): 131-150.
- Deng, Y., C. C. Wang, K. W. Choy, Q. Du, J. Chen, Q. Wang, L. Li, T. K. Chung and T. Tang (2014). "Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: principles, challenges, and new strategies." Gene **538**(2): 217-227.
- Di Certo, M. G., N. Corbi, T. Bruno, S. Iezzi, F. De Nicola, A. Desantis, M. T. Ciotti, E. Mattei, A. Floridi, M. Fanciulli and C. Passananti (2007). "NRAGE associates with the anti-apoptotic factor Che-1 and regulates its degradation to induce cell death." J Cell Sci **120**(Pt 11): 1852-1858.
- Dick, F. A. and N. Dyson (2003). "pRB contains an E2F1-specific binding domain that allows E2F1-induced apoptosis to be regulated separately from other E2F activities." Mol Cell **12**(3): 639-649.
- Dimova, D. K. and N. J. Dyson (2005). "The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces." Oncogene **24**(17): 2810-2826.
- Dominguez-Sola, D. and J. Gautier (2014). "MYC and the control of DNA replication." Cold Spring Harb Perspect Med **4**(6).
- Donati, G., E. Brighenti, M. Vici, G. Mazzini, D. Trere, L. Montanaro and M. Derenzini (2011). "Selective inhibition of rRNA transcription downregulates E2F-1: a new p53-independent mechanism linking cell growth to cell proliferation." J Cell Sci **124**(Pt 17): 3017-3028.
- Dong, P., M. V. Maddali, J. K. Srimani, F. Th lot, J. R. Nevins, B. Mathey-Prevot and L. You (2014). "Division of labour between Myc and G1 cyclins in cell cycle commitment and pace control." Nat Commun **5**.
- Doyle, J. M., J. Gao, J. Wang, M. Yang and P. R. Potts (2010). "MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases." Mol Cell **39**(6): 963-974.
- Druker, B. J., M. Talpaz, D. J. Resta, B. Peng, E. Buchdunger, J. M. Ford, N. B. Lydon, H. Kantarjian, R. Capdeville, S. Ohno-Jones and C. L. Sawyers (2001). "Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia." N Engl J Med **344**(14): 1031-1037.
- Du, Q., Y. Zhang, X. X. Tian, Y. Li and W. G. Fang (2009). "MAGE-D1 inhibits proliferation, migration and invasion of human breast cancer cells." Oncol Rep **22**(3): 659-665.

- Duan, Z., Y. Duan, D. E. Lamendola, R. Z. Yusuf, R. Naem, R. T. Penson and M. V. Seiden (2003). "Overexpression of MAGE/GAGE genes in paclitaxel/doxorubicin-resistant human cancer cell lines." Clin Cancer Res **9**(7): 2778-2785.
- Duesberg, P. H. and P. K. Vogt (1979). "Avian acute leukemia viruses MC29 and MH2 share specific RNA sequences: evidence for a second class of transforming genes." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(4): 1633-1637.
- Dulic, V., W. K. Kaufmann, S. J. Wilson, T. D. Tlsty, E. Lees, J. W. Harper, S. J. Elledge and S. I. Reed (1994). "p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest." Cell **76**(6): 1013-1023.
- Eden, A., F. Gaudet, A. Waghmare and R. Jaenisch (2003). "Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation." Science **300**(5618): 455.
- Efeyan, A. and M. Serrano (2007). "p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes." Cell Cycle **6**(9): 1006-1010.
- Egger, G., G. Liang, A. Aparicio and P. A. Jones (2004). "Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy." Nature **429**(6990): 457-463.
- Ehrlich, M. (2002). "DNA methylation in cancer: too much, but also too little." Oncogene **21**(35): 5400-5413.
- Eilers, M. and R. N. Eisenman (2008). "Myc's broad reach." Genes Dev **22**(20): 2755-2766.
- Eilers, M., D. Picard, K. R. Yamamoto and J. M. Bishop (1989). "Chimaeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells." Nature **340**(6228): 66-68.
- Ellwood-Yen, K., T. G. Graeber, J. Wongvipat, M. L. Iruela-Arispe, J. Zhang, R. Matusik, G. V. Thomas and C. L. Sawyers (2003). "Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors." Cancer Cell **4**(3): 223-238.
- Essick, E. E. and F. Sam (2010). "Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders, aging and cancer." Oxid Med Cell Longev **3**(3): 168-177.
- Everett, R. D., S. Rechter, P. Papior, N. Tavalai, T. Stamminger and A. Orr (2006). "PML contributes to a cellular mechanism of repression of herpes simplex virus type 1 infection that is inactivated by ICP0." J Virol **80**(16): 7995-8005.
- Ewen, M. E., H. K. Sluss, C. J. Sherr, H. Matsushime, J. Kato and D. M. Livingston (1993). "Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins." Cell **73**(3): 487-497.
- Eymin, B., L. Karayan, P. Seite, C. Brambilla, E. Brambilla, C. J. Larsen and S. Gazzeri (2001). "Human ARF binds E2F1 and inhibits its transcriptional activity." Oncogene **20**(9): 1033-1041.
- Ezhevsky, S. A., A. Ho, M. Becker-Hapak, P. K. Davis and S. F. Dowdy (2001). "Differential regulation of retinoblastoma tumor suppressor protein by G(1) cyclin-dependent kinase complexes in vivo." Mol Cell Biol **21**(14): 4773-4784.
- Fakharzadeh, S. S., S. P. Trusko and D. L. George (1991). "Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line." EMBO J **10**(6): 1565-1569.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-767.
- Feinberg, A. P., R. Ohlsson and S. Henikoff (2006). "The epigenetic progenitor origin of human cancer." Nat Rev Genet **7**(1): 21-33.
- Feinberg, A. P. and B. Tycko (2004). "The history of cancer epigenetics." Nat Rev Cancer **4**(2): 143-153.
- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1983). "Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers." Biochem Biophys Res Commun **111**(1): 47-54.
- Feng, Y., J. Gao and M. Yang (2011). "When MAGE meets RING: insights into biological functions of MAGE proteins." Protein Cell **2**(1): 7-12.
- Ferbeyre, G., E. de Stanchina, E. Querido, N. Baptiste, C. Prives and S. W. Lowe (2000). "PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence." Genes Dev **14**(16): 2015-2027.
- Fernandez, P. C., S. R. Frank, L. Wang, M. Schroeder, S. Liu, J. Greene, A. Cocito and B. Amati (2003). "Genomic targets of the human c-Myc protein." Genes Dev **17**(9): 1115-1129.
- Feuerstein, N., P. K. Chan and J. J. Mond (1988). "Identification of numatrin, the nuclear matrix protein associated with induction of mitogenesis, as the nucleolar protein B23. Implication for the role of the nucleolus in early transduction of mitogenic signals." J Biol Chem **263**(22): 10608-10612.

- Fogal, V., M. Gostissa, P. Sandy, P. Zacchi, T. Sternsdorf, K. Jensen, P. P. Pandolfi, H. Will, C. Schneider and G. Del Sal (2000). "Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform." EMBO J **19**(22): 6185-6195.
- Fortini, M. E. and S. Artavanis-Tsakonas (1994). "The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling." Cell **79**(2): 273-282.
- Fujioka, S., C. Schmidt, G. M. Sclabas, Z. Li, H. Pelicano, B. Peng, A. Yao, J. Niu, W. Zhang, D. B. Evans, J. L. Abbruzzese, P. Huang and P. J. Chiao (2004). "Stabilization of p53 is a novel mechanism for proapoptotic function of NF-kappaB." J Biol Chem **279**(26): 27549-27559.
- Futreal, P. A., L. Coin, M. Marshall, T. Down, T. Hubbard, R. Wooster, N. Rahman and M. R. Stratton (2004). "A census of human cancer genes." Nat Rev Cancer **4**(3): 177-183.
- Gamberi, G., M. S. Benassi, T. Bohling, P. Ragazzini, L. Molendini, M. R. Sollazzo, F. Pompetti, M. Merli, G. Magagnoli, A. Balladelli and P. Picci (1998). "C-myc and c-fos in human osteosarcoma: prognostic value of mRNA and protein expression." Oncology **55**(6): 556-563.
- Gannon, J. V., R. Greaves, R. Iggo and D. P. Lane (1990). "Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form." EMBO J **9**(5): 1595-1602.
- Garraway, L. A. and E. S. Lander (2013). "Lessons from the cancer genome." Cell **153**(1): 17-37.
- Gaudet, F., J. G. Hodgson, A. Eden, L. Jackson-Grusby, J. Dausman, J. W. Gray, H. Leonhardt and R. Jaenisch (2003). "Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation." Science **300**(5618): 489-492.
- Gayther, S. A., S. J. Batley, L. Linger, A. Bannister, K. Thorpe, S. F. Chin, Y. Daigo, P. Russell, A. Wilson, H. M. Sowter, J. D. Delhanty, B. A. Ponder, T. Kouzarides and C. Caldas (2000). "Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers." Nat Genet **24**(3): 300-303.
- Gerard, M., L. Hernandez, R. Wevrick and C. L. Stewart (1999). "Disruption of the mouse necdin gene results in early post-natal lethality." Nat Genet **23**(2): 199-202.
- Giaccia, A. J. and M. B. Kastan (1998). "The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals." Genes Dev **12**(19): 2973-2983.
- Giacinti, C. and A. Giordano (2006). "RB and cell cycle progression." Oncogene **25**(38): 5220-5227.
- Gjerset, R. A. (2006). "DNA damage, p14ARF, nucleophosmin (NPM/B23), and cancer." J Mol Histol **37**(5-7): 239-251.
- Goldstein, M., I. Meller and A. Orr-Urtreger (2007). "FGFR1 over-expression in primary rhabdomyosarcoma tumors is associated with hypomethylation of a 5' CpG island and abnormal expression of the AKT1, NOG, and BMP4 genes." Genes Chromosomes Cancer **46**(11): 1028-1038.
- Grana, X., J. Garriga and X. Mayol (1998). "Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth." Oncogene **17**(25): 3365-3383.
- Grandinetti, K. B. and G. David (2008). "Sin3B: an essential regulator of chromatin modifications at E2F target promoters during cell cycle withdrawal." Cell Cycle **7**(11): 1550-1554.
- Greenman, C., P. Stephens, R. Smith, G. L. Dalgliesh, C. Hunter, G. Bignell, H. Davies, J. Teague, A. Butler, C. Stevens, S. Edkins, S. O'Meara, I. Vastrik, E. E. Schmidt, T. Avis, S. Barthorpe, G. Bhamra, G. Buck, B. Choudhury, J. Clements, J. Cole, E. Dicks, S. Forbes, K. Gray, K. Halliday, R. Harrison, K. Hills, J. Hinton, A. Jenkinson, D. Jones, A. Menzies, T. Mironenko, J. Perry, K. Raine, D. Richardson, R. Shepherd, A. Small, C. Tofts, J. Varian, T. Webb, S. West, S. Widada, A. Yates, D. P. Cahill, D. N. Louis, P. Goldstraw, A. G. Nicholson, F. Brasseur, L. Looijenga, B. L. Weber, Y. E. Chiew, A. DeFazio, M. F. Greaves, A. R. Green, P. Campbell, E. Birney, D. F. Easton, G. Chenevix-Trench, M. H. Tan, S. K. Khoo, B. T. Teh, S. T. Yuen, S. Y. Leung, R. Wooster, P. A. Futreal and M. R. Stratton (2007). "Patterns of somatic mutation in human cancer genomes." Nature **446**(7132): 153-158.
- Grigoriadis, A., O. L. Caballero, K. S. Hoek, L. da Silva, Y. T. Chen, S. J. Shin, A. A. Jungbluth, L. D. Miller, D. Clouston, J. Cebon, L. J. Old, S. R. Lakhani, A. J. Simpson and A. M. Neville (2009). "CT-X antigen expression in human breast cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(32): 13493-13498.
- Grinberg, A. V., C. D. Hu and T. K. Kerppola (2004). "Visualization of Myc/Max/Mad family dimers and the competition for dimerization in living cells." Mol Cell Biol **24**(10): 4294-4308.
- Grossman, S. R. (2001). "p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response." Eur J Biochem **268**(10): 2773-2778.

- Guo, A., P. Salomoni, J. Luo, A. Shih, S. Zhong, W. Gu and P. P. Pandolfi (2000). "The function of PML in p53-dependent apoptosis." *Nat Cell Biol* **2**(10): 730-736.
- Hahn, W. C. and R. A. Weinberg (2002). "Rules for making human tumor cells." *N Engl J Med* **347**(20): 1593-1603.
- Harbour, J. W. and D. C. Dean (2001). "Corepressors and retinoblastoma protein function." *Curr Top Microbiol Immunol* **254**: 137-144.
- Harris, S. L. and A. J. Levine (2005). "The p53 pathway: positive and negative feedback loops." *Oncogene* **24**(17): 2899-2908.
- Hartwell, L. H. and M. B. Kastan (1994). "Cell cycle control and cancer." *Science* **266**(5192): 1821-1828.
- Hasegawa, K. and K. Yoshikawa (2008). "Necdin regulates p53 acetylation via Sirtuin1 to modulate DNA damage response in cortical neurons." *J Neurosci* **28**(35): 8772-8784.
- Hatakeyama, M. and R. A. Weinberg (1995). "The role of RB in cell cycle control." *Prog Cell Cycle Res* **1**: 9-19.
- Haupt, Y., R. Maya, A. Kazaz and M. Oren (1997). "Mdm2 promotes the rapid degradation of p53." *Nature* **387**(6630): 296-299.
- Haverkos, H. W. (2004). "Viruses, chemicals and co-carcinogenesis." *Oncogene* **23**(38): 6492-6499.
- Herceg, Z. and P. Hainaut (2007). "Genetic and epigenetic alterations as biomarkers for cancer detection, diagnosis and prognosis." *Mol Oncol* **1**(1): 26-41.
- Herin, M., C. Lemoine, P. Weynants, F. Vessiere, A. Van Pel, A. Knuth, R. Devos and T. Boon (1987). "Production of stable cytolytic T-cell clones directed against autologous human melanoma." *Int J Cancer* **39**(3): 390-396.
- Ho, A. and S. F. Dowdy (2002). "Regulation of G(1) cell-cycle progression by oncogenes and tumor suppressor genes." *Curr Opin Genet Dev* **12**(1): 47-52.
- Hoglund, M., D. Gisselsson, N. Mandahl and F. Mitelman (2005). "Ewing tumours and synovial sarcomas have critical features of karyotype evolution in common with epithelial tumours." *Int J Cancer* **116**(3): 401-406.
- Holzel, M., F. Kohlhuber, I. Schlosser, D. Holzel, B. Luscher and D. Eick (2001). "Myc/Max/Mad regulate the frequency but not the duration of productive cell cycles." *EMBO Rep* **2**(12): 1125-1132.
- Honda, R., H. Tanaka and H. Yasuda (1997). "Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53." *FEBS Lett* **420**(1): 25-27.
- Hong, J. A., Y. Kang, Z. Abdullaev, P. T. Flanagan, S. D. Pack, M. R. Fischette, M. T. Adnani, D. I. Loukinov, S. Vatinin, J. I. Risinger, M. Custer, G. A. Chen, M. Zhao, D. M. Nguyen, J. C. Barrett, V. V. Lobanenkov and D. S. Schrupp (2005). "Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the NY-ESO-1 promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells." *Cancer Res* **65**(17): 7763-7774.
- Hsieh, J. K., S. Fredersdorf, T. Kouzarides, K. Martin and X. Lu (1997). "E2F1-induced apoptosis requires DNA binding but not transactivation and is inhibited by the retinoblastoma protein through direct interaction." *Genes Dev* **11**(14): 1840-1852.
- Hsieh, J. K., D. Yap, D. J. O'Connor, V. Fogal, L. Fallis, F. Chan, S. Zhong and X. Lu (2002). "Novel function of the cyclin A binding site of E2F in regulating p53-induced apoptosis in response to DNA damage." *Mol Cell Biol* **22**(1): 78-93.
- Hussein, Y. M., A. F. Ghareib, R. H. Mohamed, M. I. Radwan and W. H. Elsayy (2012). "MAGE-3 and MAGE-4 genes as possible markers for early detection of metastases in hepatitis C virus Egyptian patients complicated by hepatocellular carcinoma." *Med Oncol* **29**(2): 994-999.
- Hussein, Y. M., A. F. Gharib, R. L. Eteawa, A. S. El-Shal, M. E. Abdel-Ghany and W. H. Elsayy (2011). "The melanoma-associated antigen-A3, -A4 genes: relation to the risk and clinicopathological parameters in breast cancer patients." *Mol Cell Biochem* **351**(1-2): 261-268.
- International Cancer Genome, C., T. J. Hudson, W. Anderson, A. Artez, A. D. Barker, C. Bell, R. R. Bernabe, M. K. Bhan, F. Calvo, I. Eerola, D. S. Gerhard, A. Guttmacher, M. Guyer, F. M. Hemsley, J. L. Jennings, D. Kerr, P. Klatt, P. Kolar, J. Kusada, D. P. Lane, F. Laplace, L. Youyong, G. Nettekoven, B. Ozenberger, J. Peterson, T. S. Rao, J. Remacle, A. J. Schafer, T. Shibata, M. R. Stratton, J. G. Vockley, K. Watanabe, H. Yang, M. M. Yuen, B. M. Knoppers, M. Bobrow, A. Cambon-Thomsen, L. G. Dressler, S. O. Dyke, Y. Joly, K. Kato, K. L. Kennedy, P. Nicolas, M. J. Parker, E. Rial-Sebbag, C. M. Romeo-Casabona, K. M. Shaw, S. Wallace, G. L. Wiesner, N. Zeps, P. Lichter, A. V. Biankin, C. Chabannon, L. Chin, B. Clement, E. de Alava, F. Degos, M. L. Ferguson, P. Geary, D. N. Hayes, T. J. Hudson, A. L. Johns, A. Kasprzyk, H. Nakagawa, R. Penny, M. A. Piris,

- R. Sarin, A. Scarpa, T. Shibata, M. van de Vijver, P. A. Futreal, H. Aburatani, M. Bayes, D. D. Botwell, P. J. Campbell, X. Estivill, D. S. Gerhard, S. M. Grimmond, I. Gut, M. Hirst, C. Lopez-Otin, P. Majumder, M. Marra, J. D. McPherson, H. Nakagawa, Z. Ning, X. S. Puente, Y. Ruan, T. Shibata, M. R. Stratton, H. G. Stunnenberg, H. Swerdlow, V. E. Velculescu, R. K. Wilson, H. H. Xue, L. Yang, P. T. Spellman, G. D. Bader, P. C. Boutros, P. J. Campbell, P. Flicek, G. Getz, R. Guigo, G. Guo, D. Haussler, S. Heath, T. J. Hubbard, T. Jiang, S. M. Jones, Q. Li, N. Lopez-Bigas, R. Luo, L. Muthuswamy, B. F. Ouellette, J. V. Pearson, X. S. Puente, V. Quesada, B. J. Raphael, C. Sander, T. Shibata, T. P. Speed, L. D. Stein, J. M. Stuart, J. W. Teague, Y. Totoki, T. Tsunoda, A. Valencia, D. A. Wheeler, H. Wu, S. Zhao, G. Zhou, L. D. Stein, R. Guigo, T. J. Hubbard, Y. Joly, S. M. Jones, A. Kasprzyk, M. Lathrop, N. Lopez-Bigas, B. F. Ouellette, P. T. Spellman, J. W. Teague, G. Thomas, A. Valencia, T. Yoshida, K. L. Kennedy, M. Axton, S. O. Dyke, P. A. Futreal, D. S. Gerhard, C. Gunter, M. Guyer, T. J. Hudson, J. D. McPherson, L. J. Miller, B. Ozenberger, K. M. Shaw, A. Kasprzyk, L. D. Stein, J. Zhang, S. A. Haider, J. Wang, C. K. Yung, A. Cros, Y. Liang, S. Gnaneshan, J. Guberman, J. Hsu, M. Bobrow, D. R. Chalmers, K. W. Hasel, Y. Joly, T. S. Kaan, K. L. Kennedy, B. M. Knoppers, W. W. Lowrance, T. Masui, P. Nicolas, E. Rial-Sebbag, L. L. Rodriguez, C. Vergely, T. Yoshida, S. M. Grimmond, A. V. Biankin, D. D. Bowtell, N. Cloonan, A. deFazio, J. R. Eshleman, D. Etemadmoghadam, B. B. Gardiner, J. G. Kench, A. Scarpa, R. L. Sutherland, M. A. Tempero, N. J. Waddell, P. J. Wilson, J. D. McPherson, S. Gallinger, M. S. Tsao, P. A. Shaw, G. M. Petersen, D. Mukhopadhyay, L. Chin, R. A. DePinho, S. Thayer, L. Muthuswamy, K. Shazand, T. Beck, M. Sam, L. Timms, V. Ballin, Y. Lu, J. Ji, X. Zhang, F. Chen, X. Hu, G. Zhou, Q. Yang, G. Tian, L. Zhang, X. Xing, X. Li, Z. Zhu, Y. Yu, J. Yu, H. Yang, M. Lathrop, J. Tost, P. Brennan, I. Holcatova, D. Zaridze, A. Brazma, L. Egevard, E. Prokhorchouk, R. E. Banks, M. Uhlen, A. Cambon-Thomsen, J. Viksna, F. Ponten, K. Skryabin, M. R. Stratton, P. A. Futreal, E. Birney, A. Borg, A. L. Borresen-Dale, C. Caldas, J. A. Foekens, S. Martin, J. S. Reis-Filho, A. L. Richardson, C. Sotiriou, H. G. Stunnenberg, G. Thoms, M. van de Vijver, L. van't Veer, F. Calvo, D. Birnbaum, H. Blanche, P. Boucher, S. Boyault, C. Chabannon, I. Gut, J. D. Masson-Jacquemier, M. Lathrop, I. Pauporte, X. Pivot, A. Vincent-Salomon, E. Tabone, C. Theillet, G. Thomas, J. Tost, I. Treilleux, F. Calvo, P. Bioulac-Sage, B. Clement, T. Decaens, F. Degos, D. Franco, I. Gut, M. Gut, S. Heath, M. Lathrop, D. Samuel, G. Thomas, J. Zucman-Rossi, P. Lichter, R. Eils, B. Brors, J. O. Korbel, A. Korshunov, P. Landgraf, H. Lehrach, S. Pfister, B. Radlwimmer, G. Reifenger, M. D. Taylor, C. von Kalle, P. P. Majumder, R. Sarin, T. S. Rao, M. K. Bhan, A. Scarpa, P. Pederzoli, R. A. Lawlor, M. Delledonne, A. Bardelli, A. V. Biankin, S. M. Grimmond, T. Gress, D. Klimstra, G. Zamboni, T. Shibata, Y. Nakamura, H. Nakagawa, J. Kusada, T. Tsunoda, S. Miyano, H. Aburatani, K. Kato, A. Fujimoto, T. Yoshida, E. Campo, C. Lopez-Otin, X. Estivill, R. Guigo, S. de Sanjose, M. A. Piris, E. Montserrat, M. Gonzalez-Diaz, X. S. Puente, P. Jares, A. Valencia, H. Himmelbauer, V. Quesada, S. Bea, M. R. Stratton, P. A. Futreal, P. J. Campbell, A. Vincent-Salomon, A. L. Richardson, J. S. Reis-Filho, M. van de Vijver, G. Thomas, J. D. Masson-Jacquemier, S. Aparicio, A. Borg, A. L. Borresen-Dale, C. Caldas, J. A. Foekens, H. G. Stunnenberg, L. van't Veer, D. F. Easton, P. T. Spellman, S. Martin, A. D. Barker, L. Chin, F. S. Collins, C. C. Compton, M. L. Ferguson, D. S. Gerhard, G. Getz, C. Gunter, A. Guttmacher, M. Guyer, D. N. Hayes, E. S. Lander, B. Ozenberger, R. Penny, J. Peterson, C. Sander, K. M. Shaw, T. P. Speed, P. T. Spellman, J. G. Vockley, D. A. Wheeler, R. K. Wilson, T. J. Hudson, L. Chin, B. M. Knoppers, E. S. Lander, P. Lichter, L. D. Stein, M. R. Stratton, W. Anderson, A. D. Barker, C. Bell, M. Bobrow, W. Burke, F. S. Collins, C. C. Compton, R. A. DePinho, D. F. Easton, P. A. Futreal, D. S. Gerhard, A. R. Green, M. Guyer, S. R. Hamilton, T. J. Hubbard, O. P. Kallioniemi, K. L. Kennedy, T. J. Ley, E. T. Liu, Y. Lu, P. Majumder, M. Marra, B. Ozenberger, J. Peterson, A. J. Schafer, P. T. Spellman, H. G. Stunnenberg, B. J. Wainwright, R. K. Wilson and H. Yang (2010). "International network of cancer genome projects." *Nature* **464**(7291): 993-998.
- Itahana, K., K. P. Bhat, A. Jin, Y. Itahana, D. Hawke, R. Kobayashi and Y. Zhang (2003). "Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation." *Mol Cell* **12**(5): 1151-1164.
  - Jaenisch, R. and A. Bird (2003). "Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals." *Nat Genet* **33 Suppl**: 245-254.
  - James, S. R., P. A. Link and A. R. Karpf (2006). "Epigenetic regulation of X-linked cancer/germline antigen genes by DNMT1 and DNMT3b." *Oncogene* **25**(52): 6975-6985.

- Jang, S. J., J. C. Soria, L. Wang, K. A. Hassan, R. C. Morice, G. L. Walsh, W. K. Hong and L. Mao (2001). "Activation of melanoma antigen tumor antigens occurs early in lung carcinogenesis." Cancer Res **61**(21): 7959-7963.
- Johnson, D. G. and R. Schneider-Broussard (1998). "Role of E2F in cell cycle control and cancer." Front Biosci **3**: d447-448.
- Jones, P. A. and S. B. Baylin (2002). "The fundamental role of epigenetic events in cancer." Nat Rev Genet **3**(6): 415-428.
- Jones, S. N., A. E. Roe, L. A. Donehower and A. Bradley (1995). "Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53." Nature **378**(6553): 206-208.
- Jungbluth, A. A., K. J. Busam, D. Kolb, K. Iversen, K. Coplan, Y. T. Chen, G. C. Spagnoli and L. J. Old (2000). "Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer." Int J Cancer **85**(4): 460-465.
- Juven, T., Y. Barak, A. Zauberman, D. L. George and M. Oren (1993). "Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene." Oncogene **8**(12): 3411-3416.
- Kan, Z., B. S. Jaiswal, J. Stinson, V. Janakiraman, D. Bhatt, H. M. Stern, P. Yue, P. M. Haverty, R. Bourgon, J. Zheng, M. Moorhead, S. Chaudhuri, L. P. Tomsho, B. A. Peters, K. Pujara, S. Cordes, D. P. Davis, V. E. Carlton, W. Yuan, L. Li, W. Wang, C. Eigenbrot, J. S. Kaminker, D. A. Eberhard, P. Waring, S. C. Schuster, Z. Modrusan, Z. Zhang, D. Stokoe, F. J. de Sauvage, M. Faham and S. Seshagiri (2010). "Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers." Nature **466**(7308): 869-873.
- Kato, J., H. Matsushime, S. W. Hiebert, M. E. Ewen and C. J. Sherr (1993). "Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4." Genes Dev **7**(3): 331-342.
- Katsura, Y. and Y. Satta (2011). "Evolutionary History of the Cancer Immunity Antigen MAGE Gene Family." PLoS One **6**(6): e20365.
- Kelly, K., B. H. Cochran, C. D. Stiles and P. Leder (1983). "Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor." Cell **35**(3 Pt 2): 603-610.
- Kim, H., S. J. Kim, S. H. Lee, H. S. Seong, K. O. Lee, C. H. Jeon, Y. J. Hong, S. M. Lee and T. H. Kim (2010). "Usefulness of melanoma antigen (MAGE) gene analysis in tissue samples from percutaneous needle aspiration biopsy of suspected lung cancer lesions." Lung Cancer **69**(3): 284-288.
- Kim, T. H., P. Leslie and Y. Zhang (2014). "Ribosomal proteins as unrevealed caretakers for cellular stress and genomic instability." Oncotarget **5**(4): 860-871.
- King, K. L. and J. A. Cidlowski (1998). "Cell cycle regulation and apoptosis." Annu Rev Physiol **60**: 601-617.
- Kirkin, A. F., K. N. Dzhandzhugazyan and J. Zeuthen (2002). "Cancer/testis antigens: structural and immunobiological properties." Cancer Invest **20**(2): 222-236.
- Kitagawa, M., T. Oyama, T. Kawashima, B. Yedvobnick, A. Kumar, K. Matsuno and K. Harigaya (2001). "A human protein with sequence similarity to Drosophila mastermind coordinates the nuclear form of notch and a CSL protein to build a transcriptional activator complex on target promoters." Mol Cell Biol **21**(13): 4337-4346.
- Klenova, E. M., H. C. Morse, 3rd, R. Ohlsson and V. V. Lobanenko (2002). "The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer." Semin Cancer Biol **12**(5): 399-414.
- Knudson, A. G. (2001). "Two genetic hits (more or less) to cancer." Nat Rev Cancer **1**(2): 157-162.
- Kondo, T., X. Zhu, S. L. Asa and S. Ezzat (2007). "The cancer/testis antigen melanoma-associated antigen-A3/A6 is a novel target of fibroblast growth factor receptor 2-IIIb through histone H3 modifications in thyroid cancer." Clin Cancer Res **13**(16): 4713-4720.
- Korgaonkar, C., J. Hagen, V. Tompkins, A. A. Frazier, C. Allamargot, F. W. Quelle and D. E. Quelle (2005). "Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function." Mol Cell Biol **25**(4): 1258-1271.
- Kowalik, T. F., J. DeGregori, J. K. Schwarz and J. R. Nevins (1995). "E2F1 overexpression in quiescent fibroblasts leads to induction of cellular DNA synthesis and apoptosis." J Virol **69**(4): 2491-2500.
- Kuerbitz, S. J., B. S. Plunkett, W. V. Walsh and M. B. Kastan (1992). "Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(16): 7491-7495.

- Kufer, P., A. Zippelius, R. Lutterbuse, I. Mecklenburg, T. Enzmann, A. Montag, D. Weckermann, B. Passlick, N. Prang, P. Reichardt, M. Dugas, M. W. Kollermann, K. Pantel and G. Riethmuller (2002). "Heterogeneous expression of MAGE-A genes in occult disseminated tumor cells: a novel multimarker reverse transcription-polymerase chain reaction for diagnosis of micrometastatic disease." *Cancer Res* **62**(1): 251-261.
- Kurooka, H. and T. Honjo (2000). "Functional interaction between the mouse notch1 intracellular region and histone acetyltransferases PCAF and GCN5." *J Biol Chem* **275**(22): 17211-17220.
- Kussie, P. H., S. Gorina, V. Marechal, B. Elenbaas, J. Moreau, A. J. Levine and N. P. Pavletich (1996). "Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain." *Science* **274**(5289): 948-953.
- Kuwako, K., H. Taniura and K. Yoshikawa (2004). "Necdin-related MAGE proteins differentially interact with the E2F1 transcription factor and the p75 neurotrophin receptor." *J Biol Chem* **279**(3): 1703-1712.
- Kwon, S., S. H. Kang, J. Ro, C. H. Jeon, J. W. Park and E. S. Lee (2005). "The melanoma antigen gene as a surveillance marker for the detection of circulating tumor cells in patients with breast carcinoma." *Cancer* **104**(2): 251-256.
- Ladelfa, M. F., L. Y. Peche, M. F. Toledo, J. E. Laiseca, C. Schneider and M. Monte (2012). "Tumor-specific MAGE proteins as regulators of p53 function." *Cancer Lett* **325**(1): 11-17.
- Ladelfa, M. F., M. F. Toledo, J. E. Laiseca and M. Monte (2011). "Interaction of p53 with tumor suppressive and oncogenic signaling pathways to control cellular reactive oxygen species production." *Antioxid Redox Signal* **15**(6): 1749-1761.
- Laduron, S., R. Deplus, S. Zhou, O. Kholmanskikh, D. Godelaine, C. De Smet, S. D. Hayward, F. Fuks, T. Boon and E. De Plaen (2004). "MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription." *Nucleic Acids Res* **32**(14): 4340-4350.
- Lallemand-Breitenbach, V. and H. de The (2010). "PML nuclear bodies." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(5): a000661.
- Lam, E. W. and N. B. La Thangue (1994). "DP and E2F proteins: coordinating transcription with cell cycle progression." *Curr Opin Cell Biol* **6**(6): 859-866.
- Lam, E. W., J. D. Morris, R. Davies, T. Crook, R. J. Watson and K. H. Vousden (1994). "HPV16 E7 oncoprotein deregulates B-myb expression: correlation with targeting of p107/E2F complexes." *EMBO J* **13**(4): 871-878.
- Lane, D. P. and S. Benichmol (1990). "p53: oncogene or anti-oncogene?" *Genes Dev* **4**(1): 1-8.
- Lane, D. P. and L. V. Crawford (1979). "T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells." *Nature* **278**(5701): 261-263.
- Latchman, D. S. (1997). "Transcription factors: an overview." *Int J Biochem Cell Biol* **29**(12): 1305-1312.
- Lawlor, E. R., L. Soucek, L. Brown-Swigart, K. Shchors, C. U. Bialucha and G. I. Evan (2006). "Reversible kinetic analysis of Myc targets in vivo provides novel insights into Myc-mediated tumorigenesis." *Cancer Res* **66**(9): 4591-4601.
- Lee, M. H. and G. Lozano (2006). "Regulation of the p53-MDM2 pathway by 14-3-3 sigma and other proteins." *Semin Cancer Biol* **16**(3): 225-234.
- Leung, J. Y., G. L. Ehmann, P. H. Giangrande and J. R. Nevins (2008). "A role for Myc in facilitating transcription activation by E2F1." *Oncogene* **27**(30): 4172-4179.
- Levine, A. J. (1997). "p53, the cellular gatekeeper for growth and division." *Cell* **88**(3): 323-331.
- Levine, A. J. (2009). "The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53." *Virology* **384**(2): 285-293.
- Levine, A. J. and M. Oren (2009). "The first 30 years of p53: growing ever more complex." *Nat Rev Cancer* **9**(10): 749-758.
- Li, J., X. Zhang, D. P. Sejas, G. C. Bagby and Q. Pang (2004). "Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53." *J Biol Chem* **279**(40): 41275-41279.
- Li, Y., D. Wu, B. Chen, A. Ingram, L. He, L. Liu, D. Zhu, A. Kapoor and D. Tang (2004). "ATM activity contributes to the tumor-suppressing functions of p14ARF." *Oncogene* **23**(44): 7355-7365.
- Lin, W. C., F. T. Lin and J. R. Nevins (2001). "Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation." *Genes Dev* **15**(14): 1833-1844.
- Lin, Y., T. Wen, X. Meng, Z. Wu, L. Zhao, P. Wang, Z. Hong and Z. Yin (2012). "The mouse Mageb18 gene encodes a ubiquitously expressed type I MAGE protein and regulates cell proliferation and apoptosis in melanoma B16-F0 cells." *Biochem J* **443**(3): 779-788.



- Link, P. A., O. Gangisetty, S. R. James, A. Woloszynska-Read, M. Tachibana, Y. Shinkai and A. R. Karpf (2009). "Distinct roles for histone methyltransferases G9a and GLP in cancer germ-line antigen gene regulation in human cancer cells and murine embryonic stem cells." *Mol Cancer Res* **7**(6): 851-862.
- Linke, S. P., K. C. Clarkin, A. Di Leonardo, A. Tsou and G. M. Wahl (1996). "A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage." *Genes Dev* **10**(8): 934-947.
- Linzer, D. I., W. Maltzman and A. J. Levine (1979). "The SV40 A gene product is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen." *Virology* **98**(2): 308-318.
- Liu, W., S. Cheng, S. L. Asa and S. Ezzat (2008). "The melanoma-associated antigen A3 mediates fibronectin-controlled cancer progression and metastasis." *Cancer Res* **68**(19): 8104-8112.
- Liu, W., A. Le, C. Hancock, A. N. Lane, C. V. Dang, T. W. Fan and J. M. Phang (2012). "Reprogramming of proline and glutamine metabolism contributes to the proliferative and metabolic responses regulated by oncogenic transcription factor c-MYC." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(23): 8983-8988.
- Lohrum, M. A., R. L. Ludwig, M. H. Kubbutat, M. Hanlon and K. H. Vousden (2003). "Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11." *Cancer Cell* **3**(6): 577-587.
- Lou, Z. and J. Chen (2006). "Cellular senescence and DNA repair." *Exp Cell Res* **312**(14): 2641-2646.
- Lowe, S. W., E. Cepero and G. Evan (2004). "Intrinsic tumour suppression." *Nature* **432**(7015): 307-315.
- Lowe, S. W. and C. J. Sherr (2003). "Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles." *Curr Opin Genet Dev* **13**(1): 77-83.
- Lucas, S., E. De Plaen and T. Boon (2000). "MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2, and MAGE-C3: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression." *Int J Cancer* **87**(1): 55-60.
- Lucas, S., C. De Smet, K. C. Arden, C. S. Viars, B. Lethe, C. Lurquin and T. Boon (1998). "Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis." *Cancer Res* **58**(4): 743-752.
- Lukas, J., B. O. Petersen, K. Holm, J. Bartek and K. Helin (1996). "Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression." *Mol Cell Biol* **16**(3): 1047-1057.
- Lurquin, C., C. De Smet, F. Brasseur, F. Muscatelli, V. Martelange, E. De Plaen, R. Brasseur, A. P. Monaco and T. Boon (1997). "Two members of the human MAGEB gene family located in Xp21.3 are expressed in tumors of various histological origins." *Genomics* **46**(3): 397-408.
- Ma, W., C. Germeau, N. Vigneron, A. S. Maernoudt, S. Morel, T. Boon, P. G. Coulie and B. J. Van den Eynde (2004). "Two new tumor-specific antigenic peptides encoded by gene MAGE-C2 and presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-A2." *Int J Cancer* **109**(5): 698-702.
- Magnaghi-Jaulin, L., R. Groisman, I. Naguibneva, P. Robin, S. Lorain, J. P. Le Villain, F. Troalen, D. Trouche and A. Harel-Bellan (1998). "Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase." *Nature* **391**(6667): 601-605.
- Malkin, D., F. P. Li, L. C. Strong, J. F. Fraumeni, Jr., C. E. Nelson, D. H. Kim, J. Kassel, M. A. Gryka, F. Z. Bischoff, M. A. Tainsky and et al. (1990). "Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms." *Science* **250**(4985): 1233-1238.
- Maltzman, W. and L. Czyzyk (1984). "UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells." *Mol Cell Biol* **4**(9): 1689-1694.
- Mallette, F. A., M. F. Gaumont-Leclerc and G. Ferbeyre (2007). "The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence." *Genes Dev* **21**(1): 43-48.
- Mancini, D., S. Singh, P. Ainsworth and D. Rodenhiser (1997). "Constitutively methylated CpG dinucleotides as mutation hot spots in the retinoblastoma gene (RB1)." *Am J Hum Genet* **61**(1): 80-87.
- Mantovani, F. and L. Banks (2001). "The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression." *Oncogene* **20**(54): 7874-7887.
- Marcar, L., N. J. Maclaine, T. R. Hupp and D. W. Meek (2010). "Mage-A cancer/testis antigens inhibit p53 function by blocking its interaction with chromatin." *Cancer Res* **70**(24): 10362-10370.
- McFarland, C. D., K. S. Korolev, G. V. Kryukov, S. R. Sunyaev and L. A. Mirny (2013). "Impact of deleterious passenger mutations on cancer progression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(8): 2910-2915.
- McFarland, C. D., L. A. Mirny and K. S. Korolev (2014). "Tug-of-war between driver and passenger mutations in cancer and other adaptive processes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**(42): 15138-15143.

- Milde-Langosch, K. (2005). "The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis." Eur J Cancer **41**(16): 2449-2461.
- Milutinovic, S., A. C. D'Alessio, N. Detich and M. Szyf (2007). "Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes." Carcinogenesis **28**(3): 560-571.
- Miyashiro, I., C. Kuo, K. Huynh, A. Iida, D. Morton, A. Bilchik, A. Giuliano and D. S. Hoon (2001). "Molecular strategy for detecting metastatic cancers with use of multiple tumor-specific MAGE-A genes." Clin Chem **47**(3): 505-512.
- Moll, U. M. and O. Petrenko (2003). "The MDM2-p53 interaction." Mol Cancer Res **1**(14): 1001-1008.
- Momand, J., D. Jung, S. Wilczynski and J. Niland (1998). "The MDM2 gene amplification database." Nucleic Acids Res **26**(15): 3453-3459.
- Momand, J., H. H. Wu and G. Dasgupta (2000). "MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein." Gene **242**(1-2): 15-29.
- Monte, M., R. Benetti, G. Buscemi, P. Sandy, G. Del Sal and C. Schneider (2003). "The cell cycle-regulated protein human GTSE-1 controls DNA damage-induced apoptosis by affecting p53 function." J Biol Chem **278**(32): 30356-30364.
- Monte, M., R. Benetti, L. Collavin, L. Marchionni, G. Del Sal and C. Schneider (2004). "hGTSE-1 expression stimulates cytoplasmic localization of p53." J Biol Chem **279**(12): 11744-11752.
- Monte, M., M. Simonatto, L. Y. Peche, D. R. Bublik, S. Gobessi, M. A. Pierotti, M. Rodolfo and C. Schneider (2006). "MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(30): 11160-11165.
- Morgado-Palacin, L., S. Llanos and M. Serrano (2012). "Ribosomal stress induces L11- and p53-dependent apoptosis in mouse pluripotent stem cells." Cell Cycle **11**(3): 503-510.
- Muscatelli, F., A. P. Walker, E. De Plaen, A. N. Stafford and A. P. Monaco (1995). "Isolation and characterization of a MAGE gene family in the Xp21.3 region." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 4987-4991.
- Nagao, T., H. Higashitsuji, K. Nonoguchi, T. Sakurai, S. Dawson, R. J. Mayer, K. Itoh and J. Fujita (2003). "MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity." J Biol Chem **278**(12): 10668-10674.
- Nakada, Y., H. Taniura, T. Uetsuki, J. Inazawa and K. Yoshikawa (1998). "The human chromosomal gene for necdin, a neuronal growth suppressor, in the Prader-Willi syndrome deletion region." Gene **213**(1-2): 65-72.
- Nambiar, M., V. Kari and S. C. Raghavan (2008). "Chromosomal translocations in cancer." Biochim Biophys Acta **1786**(2): 139-152.
- Narod, S. A. and W. D. Foulkes (2004). "BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond." Nat Rev Cancer **4**(9): 665-676.
- Niinobe, M., K. Koyama and K. Yoshikawa (2000). "Cellular and subcellular localization of necdin in fetal and adult mouse brain." Dev Neurosci **22**(4): 310-319.
- Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." Science **194**(4260): 23-28.
- Nozawa, Y., N. Van Belzen, A. C. Van der Made, W. N. Dinjens and F. T. Bosman (1996). "Expression of nucleophosmin/B23 in normal and neoplastic colorectal mucosa." J Pathol **178**(1): 48-52.
- O'Connell, B. C. (2003). "A large scale genetic analysis of c-Myc-regulated gene expression patterns." J. Biol. Chem. **278**: 12563-12573.
- O'Donnell, K. A., E. A. Wentzel, K. I. Zeller, C. V. Dang and J. T. Mendell (2005). "c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression." Nature **435**(7043): 839-843.
- Oaks, M. K., J. P. Hanson, Jr. and D. P. O'Malley (1994). "Molecular cytogenetic mapping of the human melanoma antigen (MAGE) gene family to chromosome region Xq27-qter: implications for MAGE immunotherapy." Cancer Res **54**(7): 1627-1629.
- Ofir-Rosenfeld, Y., K. Boggs, D. Michael, M. B. Kastan and M. Oren (2008). "Mdm2 regulates p53 mRNA translation through inhibitory interactions with ribosomal protein L26." Mol Cell **32**(2): 180-189.
- Oliner, J. D., K. W. Kinzler, P. S. Meltzer, D. L. George and B. Vogelstein (1992). "Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas." Nature **358**(6381): 80-83.
- Olivier, M., R. Eeles, M. Hollstein, M. A. Khan, C. C. Harris and P. Hainaut (2002). "The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users." Hum Mutat **19**(6): 607-614.

- Osterlund, C., V. Tohonen, K. O. Forslund and K. Nordqvist (2000). "MAGE-b4, a novel melanoma antigen (MAGE) gene specifically expressed during germ cell differentiation." *Cancer Res* **60**(4): 1054-1061.
- Ozenne, P., B. Eymin, E. Brambilla and S. Gazzeri (2010). "The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer." *Int J Cancer* **127**(10): 2239-2247.
- Pabst, C., J. Zustin, F. Jacobsen, T. Luetkens, N. Kroger, G. Schilling, C. Bokemeyer, G. Sauter, D. Atanackovic and A. Marx (2010). "Expression and prognostic relevance of MAGE-C1/CT7 and MAGE-C2/CT10 in osteolytic lesions of patients with multiple myeloma." *Exp Mol Pathol* **89**(2): 175-181.
- Paggi, M. G., A. Baldi, F. Bonetto and A. Giordano (1996). "Retinoblastoma protein family in cell cycle and cancer: a review." *J Cell Biochem* **62**(3): 418-430.
- Pani, G. and T. Galeotti (2011). "Role of MnSOD and p66shc in mitochondrial response to p53." *Antioxid Redox Signal* **15**(6): 1715-1727.
- Pardal, R., M. F. Clarke and S. J. Morrison (2003). "Applying the principles of stem-cell biology to cancer." *Nat Rev Cancer* **3**(12): 895-902.
- Park, J. H., G. H. Kong and S. W. Lee (2002). "hMAGE-A1 overexpression reduces TNF-alpha cytotoxicity in ME-180 cells." *Mol Cells* **14**(1): 122-129.
- Park, J. W., T. K. Kwon, I. H. Kim, S. S. Sohn, Y. S. Kim, C. I. Kim, O. S. Bae, K. S. Lee, K. D. Lee, C. S. Lee, H. K. Chang, B. K. Choe, S. Y. Ahn and C. H. Jeon (2002). "A new strategy for the diagnosis of MAGE-expressing cancers." *J Immunol Methods* **266**(1-2): 79-86.
- Parmigiani, G., S. Boca, J. Lin, K. W. Kinzler, V. Velculescu and B. Vogelstein (2009). "Design and analysis issues in genome-wide somatic mutation studies of cancer." *Genomics* **93**(1): 17-21.
- Pasmant, E., I. Laurendeau, D. Heron, M. Vidaud, D. Vidaud and I. Bieche (2007). "Characterization of a germ-line deletion, including the entire INK4/ARF locus, in a melanoma-neural system tumor family: identification of ANRIL, an antisense noncoding RNA whose expression coclusters with ARF." *Cancer Res* **67**(8): 3963-3969.
- Patel, J. H., A. P. Loboda, M. K. Showe, L. C. Showe and S. B. McMahon (2004). "Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC." *Nat Rev Cancer* **4**(7): 562-568.
- Patel, J. H., A. P. Loboda, M. K. Showe, L. C. Showe and S. B. McMahon (2004). "Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC." *Nat Rev Cancer* **4**(7): 562-568.
- Pauklin, S., A. Kristjuhan, T. Maimets and V. Jaks (2005). "ARF and ATM/ATR cooperate in p53-mediated apoptosis upon oncogenic stress." *Biochem Biophys Res Commun* **334**(2): 386-394.
- Pavletich, N. P. (1999). "Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors." *J Mol Biol* **287**(5): 821-828.
- Pawson, T. (1993). "Signal transduction--a conserved pathway from the membrane to the nucleus." *Dev Genet* **14**(5): 333-338.
- Pearson, M., R. Carbone, C. Sebastiani, M. Cioce, M. Fagioli, S. Saito, Y. Higashimoto, E. Appella, S. Minucci, P. P. Pandolfi and P. G. Pelicci (2000). "PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras." *Nature* **406**(6792): 207-210.
- Peche, L. Y., M. Scolz, M. F. Ladelfa, M. Monte and C. Schneider (2012). "MAGEA2 restrains cellular senescence by targeting the function of PMLIV/p53 axis at the PML-NBs." *Cell Death Differ* **19**(6): 926-936.
- Pflaum, J., S. Schlosser and M. Müller (2014). "P53 family and cellular stress responses in cancer." *Frontiers in Oncology* **4**.
- Phillips, A. C., S. Bates, K. M. Ryan, K. Helin and K. H. Vousden (1997). "Induction of DNA synthesis and apoptosis are separable functions of E2F-1." *Genes Dev* **11**(14): 1853-1863.
- Picksley, S. M. and D. P. Lane (1993). "The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53?" *Bioessays* **15**(10): 689-690.
- Pipas, J. M. and A. J. Levine (2001). "Role of T antigen interactions with p53 in tumorigenesis." *Semin Cancer Biol* **11**(1): 23-30.
- Pleasance, E. D., R. K. Cheetham, P. J. Stephens, D. J. McBride, S. J. Humphray, C. D. Greenman, I. Varela, M. L. Lin, G. R. Ordenez, G. R. Bignell, K. Ye, J. Alipaz, M. J. Bauer, D. Beare, A. Butler, R. J. Carter, L. Chen, A. J. Cox, S. Edkins, P. I. Kokko-Gonzales, N. A. Gormley, R. J. Grocock, C. D. Haudenschild, M. M. Hims, T. James, M. Jia, Z. Kingsbury, C. Leroy, J. Marshall, A. Menzies, L. J. Mudie, Z. Ning, T. Royce, O. B. Schulz-Trieglaff, A. Spiridou, L. A. Stebbings, L. Szajkowski, J. Teague, D. Williamson, L. Chin, M. T. Ross, P. J. Campbell, D. R. Bentley, P. A. Futreal and M. R.

- Stratton (2010). "A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome." *Nature* **463**(7278): 191-196.
- Polager, S. and D. Ginsberg (2008). "E2F - at the crossroads of life and death." *Trends Cell Biol* **18**(11): 528-535.
  - Pold, M., J. Zhou, G. L. Chen, J. M. Hall, R. A. Vescio and J. R. Berenson (1999). "Identification of a new, unorthodox member of the MAGE gene family." *Genomics* **59**(2): 161-167.
  - Pomerantz, J., N. Schreiber-Agus, N. J. Liegeois, A. Silverman, L. Alland, L. Chin, J. Potes, K. Chen, I. Orlow, H. W. Lee, C. Cordon-Cardo and R. A. DePinho (1998). "The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53." *Cell* **92**(6): 713-723.
  - Prior, I. A., P. D. Lewis and C. Mattos (2012). "A comprehensive survey of Ras mutations in cancer." *Cancer Res* **72**(10): 2457-2467.
  - Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke and I. L. Weissman (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." *Nature* **414**(6859): 105-111.
  - Rideout, W. M., 3rd, G. A. Coetzee, A. F. Olumi and P. A. Jones (1990). "5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes." *Science* **249**(4974): 1288-1290.
  - Robinson, H. L. (1982). "Retroviruses and cancer." *Rev Infect Dis* **4**(5): 1015-1025.
  - Robles, A. I. and C. C. Harris (2010). "Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(3): a001016.
  - Rocha, S., K. J. Campbell and N. D. Perkins (2003). "p53- and Mdm2-independent repression of NF-kappa B transactivation by the ARF tumor suppressor." *Mol Cell* **12**(1): 15-25.
  - Rocha, S., M. D. Garrett, K. J. Campbell, K. Schumm and N. D. Perkins (2005). "Regulation of NF-kappaB and p53 through activation of ATR and Chk1 by the ARF tumour suppressor." *EMBO J* **24**(6): 1157-1169.
  - Rocha, S. and N. D. Perkins (2005). "ARF the integrator: linking NF-kappaB, p53 and checkpoint kinases." *Cell Cycle* **4**(6): 756-759.
  - Rodenhiser, D., P. Chakraborty, J. Andrews, P. Ainsworth, D. Mancini, E. Lopes and S. Singh (1996). "Heterogenous point mutations in the BRCA1 breast cancer susceptibility gene occur in high frequency at the site of homonucleotide tracts, short repeats and methylatable CpG/CpNpG motifs." *Oncogene* **12**(12): 2623-2629.
  - Rogner, U. C., K. Wilke, E. Steck, B. Korn and A. Poustka (1995). "The melanoma antigen gene (MAGE) family is clustered in the chromosomal band Xq28." *Genomics* **29**(3): 725-731.
  - Rowland, B. D., S. G. Denisov, S. Douma, H. G. Stunnenberg, R. Bernards and D. S. Peeper (2002). "E2F transcriptional repressor complexes are critical downstream targets of p19(ARF)/p53-induced proliferative arrest." *Cancer Cell* **2**(1): 55-65.
  - Ryu, S., S. Jimi, Y. Eura, T. Kato and S. Takebayashi (1999). "Strong intracellular and negative peripheral expression of fibronectin in tumor cells contribute to invasion and metastasis in papillary thyroid carcinoma." *Cancer Lett* **146**(1): 103-109.
  - Sadikovic, B., K. Al-Romaih, J. A. Squire and M. Zielenska (2008). "Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer." *Curr Genomics* **9**(6): 394-408.
  - Sakurai, T., K. Itoh, H. Higashitsuji, T. Nagao, K. Nonoguchi, T. Chiba and J. Fujita (2004). "A cleaved form of MAGE-A4 binds to Miz-1 and induces apoptosis in human cells." *J Biol Chem* **279**(15): 15505-15514.
  - Salehi, A. H., P. P. Roux, C. J. Kubu, C. Zeindler, A. Bhakar, L. L. Tannis, J. M. Verdi and P. A. Barker (2000). "NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis." *Neuron* **27**(2): 279-288.
  - Salomoni, P. and P. P. Pandolfi (2002). "The role of PML in tumor suppression." *Cell* **108**(2): 165-170.
  - Sancar, A., L. A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kacmaz and S. Linn (2004). "Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints." *Annu Rev Biochem* **73**: 39-85.
  - Sang, M., Y. Lian, X. Zhou and B. Shan (2011). "MAGE-A family: attractive targets for cancer immunotherapy." *Vaccine* **29**(47): 8496-8500.
  - Sang, M., L. Wang, C. Ding, X. Zhou, B. Wang, L. Wang, Y. Lian and B. Shan (2011). "Melanoma-associated antigen genes - an update." *Cancer Lett* **302**(2): 85-90.
  - Santoni-Rugiu, E., D. Duro, T. Farkas, I. S. Mathiasen, M. Jaattela, J. Bartek and J. Lukas (2002). "E2F activity is essential for survival of Myc-overexpressing human cancer cells." *Oncogene* **21**(42): 6498-6509.

- Santos-Rosa, H. and C. Caldas (2005). "Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer." *Eur J Cancer* **41**(16): 2381-2402.
- Sarkar, S., K. P. Julicher, M. S. Burger, V. Della Valle, C. J. Larsen, T. R. Yeager, T. B. Grossman, R. W. Nickells, C. Protzel, D. F. Jarrard and C. A. Reznikoff (2000). "Different combinations of genetic/epigenetic alterations inactivate the p53 and pRb pathways in invasive human bladder cancers." *Cancer Res* **60**(14): 3862-3871.
- Sarnow, P., Y. S. Ho, J. Williams and A. J. Levine (1982). "Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells." *Cell* **28**(2): 387-394.
- Scanlan, M. J., C. M. Gordon, B. Williamson, S. Y. Lee, Y. T. Chen, E. Stockert, A. Jungbluth, G. Ritter, D. Jager, E. Jager, A. Knuth and L. J. Old (2002). "Identification of cancer/testis genes by database mining and mRNA expression analysis." *Int J Cancer* **98**(4): 485-492.
- Scanlan, M. J., A. O. Gure, A. A. Jungbluth, L. J. Old and Y. T. Chen (2002). "Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy." *Immunol Rev* **188**: 22-32.
- Scott, A. M., J. D. Wolchok and L. J. Old (2012). "Antibody therapy of cancer." *Nat Rev Cancer* **12**(4): 278-287.
- Schedin, P. and A. Elias (2004). "Multistep tumorigenesis and the microenvironment." *Breast Cancer Res* **6**(2): 93-101.
- Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine and P. M. Howley (1990). "The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53." *Cell* **63**(6): 1129-1136.
- Schlosser, I., M. Holzel, R. Hoffmann, H. Burtscher, F. Kohlhuber, M. Schuhmacher, R. Chapman, U. H. Weidle and D. Eick (2005). "Dissection of transcriptional programmes in response to serum and c-Myc in a human B-cell line." *Oncogene* **24**(3): 520-524.
- Schwarz, J. K., C. H. Bassing, I. Kovesdi, M. B. Datto, M. Blazing, S. George, X. F. Wang and J. R. Nevins (1995). "Expression of the E2F1 transcription factor overcomes type beta transforming growth factor-mediated growth suppression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(2): 483-487.
- Sharpless, N. E. (2005). "INK4a/ARF: a multifunctional tumor suppressor locus." *Mutat Res* **576**(1-2): 22-38.
- Sherr, C. J. (2004). "Principles of tumor suppression." *Cell* **116**(2): 235-246.
- Sherr, C. J. (2006). "Divorcing ARF and p53: an unsettled case." *Nat Rev Cancer* **6**(9): 663-673.
- Sherr, C. J. (2012). "Ink4-Arf locus in cancer and aging." *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **1**(5): 731-741.
- Sherr, C. J. and F. McCormick (2002). "The RB and p53 pathways in cancer." *Cancer Cell* **2**(2): 103-112.
- Singh, S. K., C. Hawkins, I. D. Clarke, J. A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R. M. Henkelman, M. D. Cusimano and P. B. Dirks (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." *Nature* **432**(7015): 396-401.
- Sionov, R. V. and Y. Haupt (1999). "The cellular response to p53: the decision between life and death." *Oncogene* **18**(45): 6145-6157.
- Somasundaram, K., T. K. MacLachlan, T. F. Burns, M. Sgagias, K. H. Cowan, B. L. Weber and W. S. el-Deiry (1999). "BRCA1 signals ARF-dependent stabilization and coactivation of p53." *Oncogene* **18**(47): 6605-6614.
- Stephens, P. J., C. D. Greenman, B. Fu, F. Yang, G. R. Bignell, L. J. Mudie, E. D. Pleasance, K. W. Lau, D. Beare, L. A. Stebbings, S. McLaren, M. L. Lin, D. J. McBride, I. Varela, S. Nik-Zainal, C. Leroy, M. Jia, A. Menzies, A. P. Butler, J. W. Teague, M. A. Quail, J. Burton, H. Swerdlow, N. P. Carter, L. A. Morsberger, C. Iacobuzio-Donahue, G. A. Follows, A. R. Green, A. M. Flanagan, M. R. Stratton, P. A. Futreal and P. J. Campbell (2011). "Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development." *Cell* **144**(1): 27-40.
- Stratton, M. R. (2011). "Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise." *Science* **331**(6024): 1553-1558.
- Stratton, M. R., P. J. Campbell and P. A. Futreal (2009). "The cancer genome." *Nature* **458**(7239): 719-724.
- Strauss, R., P. Hamerlik, A. Lieber and J. Bartek (2012). "Regulation of stem cell plasticity: mechanisms and relevance to tissue biology and cancer." *Mol Ther* **20**(5): 887-897.
- Sugimoto, M., M. L. Kuo, M. F. Roussel and C. J. Sherr (2003). "Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing." *Mol Cell* **11**(2): 415-424.

- Sun, X. X., M. S. Dai and H. Lu (2007). "5-fluorouracil activation of p53 involves an MDM2-ribosomal protein interaction." *J Biol Chem* **282**(11): 8052-8059.
- Sun, X. X., T. DeVine, K. B. Challagundla and M. S. Dai (2011). "Interplay between ribosomal protein S27a and MDM2 protein in p53 activation in response to ribosomal stress." *J Biol Chem* **286**(26): 22730-22741.
- Sun, X. X., Y. G. Wang, D. P. Xirodimas and M. S. Dai (2010). "Perturbation of 60 S ribosomal biogenesis results in ribosomal protein L5- and L11-dependent p53 activation." *J Biol Chem* **285**(33): 25812-25821.
- Tachibana, M., J. Ueda, M. Fukuda, N. Takeda, T. Ohta, H. Iwanari, T. Sakihama, T. Kodama, T. Hamakubo and Y. Shinkai (2005). "Histone methyltransferases G9a and GLP form heteromeric complexes and are both crucial for methylation of euchromatin at H3-K9." *Genes Dev* **19**(7): 815-826.
- Takahashi, T., M. M. Nau, I. Chiba, M. J. Birrer, R. K. Rosenberg, M. Vinocour, M. Levitt, H. Pass, A. F. Gazdar and J. D. Minna (1989). "p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer." *Science* **246**(4929): 491-494.
- Taniura, H., K. Matsumoto and K. Yoshikawa (1999). "Physical and functional interactions of neuronal growth suppressor necdin with p53." *J Biol Chem* **274**(23): 16242-16248.
- Taniura, H., N. Taniguchi, M. Hara and K. Yoshikawa (1998). "Necdin, a postmitotic neuron-specific growth suppressor, interacts with viral transforming proteins and cellular transcription factor E2F1." *J Biol Chem* **273**(2): 720-728.
- Tchelebi, L., H. Ashamalla and P. R. Graves (2014). "Mutant p53 and the response to chemotherapy and radiation." *Subcell Biochem* **85**: 133-159.
- Tian, X. X., D. Rai, J. Li, C. Zou, Y. Bai, D. Wazer, V. Band and Q. Gao (2005). "BRCA2 suppresses cell proliferation via stabilizing MAGE-D1." *Cancer Res* **65**(11): 4747-4753.
- Tsukamoto, N., K. Morita, M. Karasawa and M. Omine (1992). "Methylation status of c-myc oncogene in leukemic cells: hypomethylation in acute leukemia derived from myelodysplastic syndromes." *Exp Hematol* **20**(9): 1061-1064.
- Tuck-Muller, C. M., A. Narayan, F. Tsien, D. F. Smeets, J. Sawyer, E. S. Fiala, O. S. Sohn and M. Ehrlich (2000). "DNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients." *Cytogenet Cell Genet* **89**(1-2): 121-128.
- Uetsuki, T., K. Takagi, H. Sugiura and K. Yoshikawa (1996). "Structure and expression of the mouse necdin gene. Identification of a postmitotic neuron-restrictive core promoter." *J Biol Chem* **271**(2): 918-924.
- Uren, A. G., J. Kool, A. Berns and M. van Lohuizen (2005). "Retroviral insertional mutagenesis: past, present and future." *Oncogene* **24**(52): 7656-7672.
- van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth and T. Boon (1991). "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma." *Science* **254**(5038): 1643-1647.
- Varmus, H. (1993). "Varmus: the view from Bethesda. Interview by Eliot Marshall." *Science* **262**(5138): 1364-1366.
- Vatolin, S., Z. Abdullaev, S. D. Pack, P. T. Flanagan, M. Custer, D. I. Loukinov, E. Pugacheva, J. A. Hong, H. Morse, 3rd, D. S. Schrupp, J. I. Risinger, J. C. Barrett and V. V. Lobanekov (2005). "Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of MAGE-A1 and reactivation of other cancer-testis genes." *Cancer Res* **65**(17): 7751-7762.
- Vennstrom, B., D. Sheiness, J. Zabielski and J. M. Bishop (1982). "Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29." *J Virol* **42**(3): 773-779.
- Vidal, A. and A. Koff (2000). "Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause." *Gene* **247**(1-2): 1-15.
- Vogelstein, B., E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits and J. L. Bos (1988). "Genetic alterations during colorectal-tumor development." *N Engl J Med* **319**(9): 525-532.
- Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (2004). "Cancer genes and the pathways they control." *Nat Med* **10**(8): 789-799.

- Vousden, K. H. and X. Lu (2002). "Live or let die: the cell's response to p53." *Nat Rev Cancer* **2**(8): 594-604.
- Wadayama, B., J. Toguchida, T. Shimizu, K. Ishizaki, M. S. Sasaki, Y. Kotoura and T. Yamamuro (1994). "Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas." *Cancer Res* **54**(11): 3042-3048.
- Wade, M., Y. C. Li and G. M. Wahl (2013). "MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy." *Nat Rev Cancer* **13**(2): 83-96.
- Wahl, G. M. and A. M. Carr (2001). "The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53." *Nat Cell Biol* **3**(12): E277-286.
- Wang, C., A. Ivanov, L. Chen, W. J. Fredericks, E. Seto, F. J. Rauscher, 3rd and J. Chen (2005). "MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation." *EMBO J* **24**(18): 3279-3290.
- Wang, C., F. J. Rauscher, 3rd, W. D. Cress and J. Chen (2007). "Regulation of E2F1 function by the nuclear corepressor KAP1." *J Biol Chem* **282**(41): 29902-29909.
- Watson, I. R., K. Takahashi, P. A. Futreal and L. Chin (2013). "Emerging patterns of somatic mutations in cancer." *Nat Rev Genet* **14**(10): 703-718.
- Weber, J. D., L. J. Taylor, M. F. Rousset, C. J. Sherr and D. Bar-Sagi (1999). "Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53." *Nat Cell Biol* **1**(1): 20-26.
- Weeraratne, S. D., V. Amani, A. Neiss, N. Teider, D. K. Scott, S. L. Pomeroy and Y. J. Cho (2011). "miR-34a confers chemosensitivity through modulation of MAGE-A and p53 in medulloblastoma." *Neuro Oncol* **13**(2): 165-175.
- Wei, G., F. Lonardo, T. Ueda, T. Kim, A. G. Huvos, J. H. Healey and M. Ladanyi (1999). "CDK4 gene amplification in osteosarcoma: reciprocal relationship with INK4A gene alterations and mapping of 12q13 amplicons." *Int J Cancer* **80**(2): 199-204.
- Wen, C. J., B. Xue, W. X. Qin, M. Yu, M. Y. Zhang, D. H. Zhao, X. Gao, J. R. Gu and C. J. Li (2004). "hNRAGE, a human neurotrophin receptor interacting MAGE homologue, regulates p53 transcriptional activity and inhibits cell proliferation." *FEBS Lett* **564**(1-2): 171-176.
- Werness, B. A., A. J. Levine and P. M. Howley (1990). "Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53." *Science* **248**(4951): 76-79.
- Wilson, E. M. (2010). "Androgen receptor molecular biology and potential targets in prostate cancer." *Ther Adv Urol* **2**(3): 105-117.
- Wolffe, A. P. (2001). "Chromatin remodeling: why it is important in cancer." *Oncogene* **20**(24): 2988-2990.
- Woloszynska-Read, A., S. R. James, P. A. Link, J. Yu, K. Odunsi and A. R. Karpf (2007). "DNA methylation-dependent regulation of BORIS/CTCF expression in ovarian cancer." *Cancer Immun* **7**: 21.
- Wu, M. H., J. H. Chang, C. C. Chou and B. Y. Yung (2002). "Involvement of nucleophosmin/B23 in the response of HeLa cells to UV irradiation." *Int J Cancer* **97**(3): 297-305.
- Wu, Z., S. Zheng and Q. Yu (2009). "The E2F family and the role of E2F1 in apoptosis." *Int J Biochem Cell Biol* **41**(12): 2389-2397.
- Xiong, X., Y. Zhao, H. He and Y. Sun (2011). "Ribosomal protein S27-like and S27 interplay with p53-MDM2 axis as a target, a substrate and a regulator." *Oncogene* **30**(15): 1798-1811.
- Xirodimas, D., M. K. Saville, C. Edling, D. P. Lane and S. Lain (2001). "Different effects of p14ARF on the levels of ubiquitinated p53 and Mdm2 in vivo." *Oncogene* **20**(36): 4972-4983.
- Yang, B., S. M. O'Herrin, J. Wu, S. Reagan-Shaw, Y. Ma, K. M. Bhat, C. Gravekamp, V. Setaluri, N. Peters, F. M. Hoffmann, H. Peng, A. V. Ivanov, A. J. Simpson and B. J. Longley (2007). "MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines." *Cancer Res* **67**(20): 9954-9962.
- Yoshimoto, M., I. W. Cunha, R. A. Coudry, F. P. Fonseca, C. H. Torres, F. A. Soares and J. A. Squire (2007). "FISH analysis of 107 prostate cancers shows that PTEN genomic deletion is associated with poor clinical outcome." *Br J Cancer* **97**(5): 678-685.
- Zeller, K. I., T. J. Haggerty, J. F. Barrett, Q. Guo, D. R. Wonsey and C. V. Dang (2001). "Characterization of nucleophosmin (B23) as a Myc target by scanning chromatin immunoprecipitation." *J Biol Chem* **276**(51): 48285-48291.
- Zeuthen, J., K. Dzhandzhugazyan, M. R. Hansen and A. F. Kirkin (1998). "The immunogenic properties of human melanomas and melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes." *Bratisk Lek Listy* **99**(8-9): 426-434.

- Zhang, W., W. Ji, X. Liu, G. Ouyang and W. Xiao (2014). "ELL inhibits E2F1 transcriptional activity by enhancing E2F1 deacetylation via recruitment of histone deacetylase 1." Mol Cell Biol **34**(4): 765-775.
- Zhang, Y., G. W. Wolf, K. Bhat, A. Jin, T. Allio, W. A. Burkhardt and Y. Xiong (2003). "Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway." Mol Cell Biol **23**(23): 8902-8912.
- Zhang, Y., N. Woodford, X. Xia and A. W. Hamburger (2003). "Repression of E2F1-mediated transcription by the ErbB3 binding protein Ebp1 involves histone deacetylases." Nucleic Acids Res **31**(8): 2168-2177.
- Zhang, Y., Y. Xiong and W. G. Yarbrough (1998). "ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways." Cell **92**(6): 725-734.
- Zhou, S., M. Fujimuro, J. J. Hsieh, L. Chen, A. Miyamoto, G. Weinmaster and S. D. Hayward (2000). "SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of NotchIC To facilitate NotchIC function." Mol Cell Biol **20**(7): 2400-2410.
- Zhou, X., Q. Hao, J. M. Liao, P. Liao and H. Lu (2013). "Ribosomal protein S14 negatively regulates c-Myc activity." J Biol Chem **288**(30): 21793-21801.
- Zhu, X., S. L. Asa and S. Ezzat (2008). "Fibroblast growth factor 2 and estrogen control the balance of histone 3 modifications targeting MAGE-A3 in pituitary neoplasia." Clin Cancer Res **14**(7): 1984-1996.
- Zhuang, R., Y. Zhu, L. Fang, X. S. Liu, Y. Tian, L. H. Chen, W. M. Ouyang, X. G. Xu, J. L. Jian, A. O. Gure, S. Fortunato, G. Ritter, L. J. Old, A. J. Simpson, Y. T. Chen, B. Jin and A. A. Jungbluth (2006). "Generation of monoclonal antibodies to cancer/testis (CT) antigen CT10/MAGE-C2." Cancer Immun **6**: 7.
- Zilfou, J. T. and S. W. Lowe (2009). "Tumor suppressive functions of p53." Cold Spring Harb Perspect Biol **1**(5): a001883.