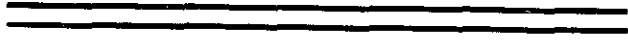


21
2e1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA 5-AZACITIDINA EN LOS NIVELES DE METILACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I MURINO EN UNA LÍNEA H-2ⁱ (LR.4).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARÍA LUISA BENÍTEZ HESS.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Dr. Guillermo Alfaro Martínez.



263806



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EFEECTO DE LA 5-AZACITIDINA EN LOS NIVELES DE METILACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I MURINO EN UNA LÍNEA H-2ⁱ (LR.4).

El presente trabajo fue desarrollado bajo la dirección del Dr. Guillermo Alfaro Martínez, en la Sección Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el Departamento de Inmunología, ubicado en el Instituto de Cancerología, México D.F., México.

AGRADECIMIENTOS

Quiero manifestar mi más sincero agradecimiento al Dr. Guillermo Alfaro, mi tutor y a mi asesor técnico, el M en IBB. Gabriel Nava Pinto, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo experimental para obtener la Licenciatura de Biología.

A ambos les agradezco el tiempo que se dedicó al planteamiento de este trabajo, así como el tiempo que dedicaron a enseñarme la manera de interpretar y difundir resultados, y además, por depositar su confianza en mi para la realización de este trabajo.

Al grupo de Inmunología: Emma, Venancio, Wilox, Gabriel, Roxana, Claudia, Sr. Gilberto, Emmy, Raquel, Sra. Amalia y al grupo de Genética, Leda, Euclides y Marisol, por brindarme ayuda en los momentos necesarios, además de sus consejos y amistad.

Finalmente, deseo agradecer a la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico (dgapa)**, por otorgarme una beca durante la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

DEDICO ESTA TESIS:

A MI MADRE:

Por apoyarme en la decisiones que he tomado en la vida, y apoyarme a terminar mis estudios profesionales.

A MIS ABUELOS:

Por estar siempre de mi lado, apoyarme e impulsarme para seguir estudiando, y así prepararme cada día más.

A TODA MI FAMILIA QUE DE UNA U OTRA FORMA SIEMPRE ME HAN BRINDADO SU APOYO.

A TODOS MIS MAESTROS:

Quienes han contribuido en mi formación profesional, académica, artística y deportiva.

A MIS QUERIDOS AMIGOS:

Gabriela, Margarita, Víctor, Claudia, Yolanda, Araceli, David, Ana, Chela, Aurorita, Román, Gabriel, Emma, Roxana, Emmy, Leda, Marisol, Venancio, Raquel, Sra. Amalia, Sr. Gilberto, Iván, Iñigo, Boris, Armando, Piolín, Salvador, Verónica, a todas mis compañeras de equipo, Sr. Maciel, Sr. Pimentel y Aída por que a lo largo del tiempo hemos compartido inolvidables momentos en los que siempre he contado con su apoyo para seguir adelante.

A JAIME:

Por haberme brindado su amistad y cariño cuando más lo he necesitado, además por compartir momentos inolvidables conmigo.

ADEMÁS QUIERO AGRADECER A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE DE ALGUNA MANERA HAN CONTRIBUIDO EN LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ATP	Adenossina Trifosfato
5- Aza	5-Azacidina
β 2m	Beta 2 microglobulina
B ₂ m	Gene de Beta 2 microglobulina
BSA	Albumina de Suero Bovino Fracción V
C	Citosina
C57BL/6J	Cepa murina con haplotipo H-2 ^b
CD4+	Linfocitos T con actividad citotóxica
CD8+	Linfocitos T que secretan interleucinas
CO ₂	Dióxido de Carbono
CpG	Citosinas unidas a guanina por medio de un enlace fosfodiester
CPH	Complejo Principal de Histocompatibilidad
DBA/2	Cepa murina con haplotipo H-2 ^d
Denhart 50x	1%Ficoll tipo 400, 1% PVP, 1% BSA, 0.5% SDS y 100mg/mlADN de Salmón
dNTP	Dinucleotidos
EDTA	Ácido Etilen Diaminotetracético
EMS	Etil-metil-sulfonato
G	Guanina

H-2 ^c	Deficiencia en la presentación de moléculas del CPH murino
H-2 K ^d , H-2D ^d y H-2L ^d	Haplotipos de los Genes Clase I del Complejo Principal de Histocompatibilidad murino
HAT	Hipoxantina, Aminopterina y Timidina
HCl	Ácido Clorhídrico
HE 10x	0.5M HEPES y 0.02M EDTA
HEPES	0.5M Acido N-(2-hidroxietyl) piperazina-N'-(2)-etanosulfónico)
HGPRT	Hipoxantina-Guanina fosforribosil transferasa
IA _α	Moléculas del CPH clase II
IA _β	Moléculas del CPH clase II
IE _α	Moléculas del CPH clase II
IE _β	Moléculas del CPH clase II
IgM	Inmunoglobulina tipo M
IgG	Inmunoglobulina tipo
L5178Y	Línea celular tumoral de la que se derivó LR.4
LR.4	Línea celular tumoral
LMP	Low Molecular mass Polipeptid Complex
μg	Microgramo
μCi	MicroCuries
mg/ml	Miligramo por mililitro
mM	Milimolar

M	Molar
5mC	5-metilcitosina
4NmC	4-N-metilcitosina
6NmA	6-metiladenina
6NmC	6-metilcitosina
N	Normal
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio en lentejas
nm	Nanometros
NTG	N-metil-N'-nitro-N-Nitrosoguanidina
³² P α -dATP	ATP marcado con fósforo alfa radioactivo
PMA	Ésteres de forból
PVP	Polivinilpirrolidona
RE	Retículo Endopásmico
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Revoluciones por Minuto
SAM	S-Adenosilmetionia
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SSC 20x	0.15M Cloruro de Sodio y 0.015M Citrato de Sodio
STET	0.1M NaCl, 10mM Tris-HCL pH=8, 1mM EDTA pH=8 y 5% TritónX-100
TAP I y TAP II	Complejo Heterodimérico encargado del transporte de antígenos peptídicos

ÍNDICE

RESUMEN		XVI
CAPÍTULO I	INTRODUCCIÓN	1
	Estructura de las moléculas del CPH murino	4
	Síntesis y ensamblaje de péptidos a moléculas de clase I	11
CAPÍTULO II	DEFICIENCIAS O DEFECTOS IMPORTANTES PARA LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS CLASE I DEL CPH	14
	Deficiencia en B2m	15
	Deficiencias en genes TAP	15
CAPÍTULO III	METILACIÓN	17
	Función de la metilación	19
	Deaminación de la citosina y 5-metilcitosina	22
	Agentes hipometilantes	24
CAPÍTULO IV		
	Antecedentes	27
	Objetivos generales:	28
	Hipótesis	28
CAPÍTULO V	MATERIALES Y MÉTODOS	29
CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTO CON 5-Azacitidina		30
	Línea celular	30
	Cepas murinas	30
	Propagación y crecimiento de LR.4	31
	Tratamiento de la línea celular LR.4 con 5-Azacitidina	31

ANÁLISIS DE ADN	31
Purificación de ADN genómico	31
Endonucleasas de restricción y digestión de ADN	32
Propiedades de las endonucleasas de restricción usadas en este trabajo	33
Electroforesis	33
Desnaturalización y transferencia del ADN a una membrana	34
ANÁLISIS DE RNA	34
Purificación de RNA	34
Electroforesis desnaturizante	35
Transferencia del RNA a una membrana	35
CUANTIFICACIÓN DE ADN Y RNA	36
VALORACIÓN DEL ESTADO DEL ADN Y RNA	36
MÉTODOS UTILIZADOS PARA OBTENER SONDAS	37
Crecimiento y cosecha de bacterias	37
Purificación del plásmido	37
Purificación de la sonda	38
CARACTERÍSTICAS DE LAS SONDAS UTILIZADAS	39
MARCAJE RADIOACTIVO POR UN CEBADOR INCORPORADO AL AZAR	40
PURIFICACION DEL ADN RADIOACTIVO POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA	40
HIBRIDACION EN FASE SOLIDA: "NORTHERN Y SOUTHERN BLOT"	41
Prehibridación sobre membranas	41
Hibridación	41
AUTORRADIOGRAFÍA	42
Rehibridación de la membrana con una sonda y eliminación total de la marca radioactiva en una membrana	42
CAPÍTULO VI	RESULTADOS
CULTIVO CELULAR	44
Propagacion <i>in vivo</i> de LR.4	44
Tratamiento de LR.4 con 5-Azacidina.	44

ANÁLISIS DE ADN POR SOUTHERN BLOT	45
Patrón de restricción de los genes K,L Y D Clase I del CPH obtenidos de la digestión con EcoRI y KpnI.	45
Diferencias en los patrones de restricción de los genes clase I del CPH de cepas murinas y líneas celulares tumorales.	47
Análisis de metilación de la cepa murina DBA/2 y de la línea celular LR.4 y cambios inducidos por efecto de la 5-Azacitidina en la línea celular tumoral LR.4	48
Patrón de restricción del gene de B ₂ m	50
ANÁLISIS DE RNA POR NORTHERN BLOT	53
Expresión de genes del CPH clase I.	53
Expresión del gen B ₂ -m.	54
CAPÍTULO VII DISCUSIÓN	56
Cultivo celular y tratamiento de la línea celular LR.4 con 5-Azacitidina	56
Variaciones fenotípicas de LR.4	57
Viabilidad celular	58
Genes clase I del CPH	59
Variaciones genotípicas.	60
Metilación de los genes del CPH clase I en LR.4	61
Efectos de la 5-Azacitidina	62
Mantenimiento de los niveles de metilación de LR.4 después de los tratamiento con: 5-Azacitidina	62
Expresión de los genes del CPH clase I	63
Gene de B ₂ -m	63
Expresión de B ₂ -m	63
Caracterización de LR.4	64
CAPÍTULO VIII CONCLUSIONES	67
CAPÍTULO IX BIBLIOGRAFÍA	69

EFFECTO DE LA 5-AZACITIDINA EN LOS NIVELES DE METILACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I MURINO EN UNA LÍNEA H-2^r (LR.4).

RESUMEN

El papel de la metilación en la regulación de genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) clase I es aún poco claro. Para una gran variedad de genes, la metilación de secuencias de ADN correlaciona de manera inversa con su expresión. Sin embargo, para genes de clase I se ha reportado que se expresan tanto en ADN hipometilado como en hipermetilado. Estas diferencias aún no se han aclarado, ya que los distintos resultados reportados se deben a la localización de las regiones analizadas, y se ha visto que las variaciones observadas dependen del tipo celular utilizado. Se ha afirmado que las regiones hipometiladas están localizadas en la región 5' del gene expresado, mientras que la hipermetilación puede darse en la región 3' no traducida.

En base a que existen variaciones en cuanto a la expresión de moléculas del CPH y la relación con niveles de metilación, se decidió estudiar los niveles de metilación de una línea celular deficiente en la presentación de antígenos por las moléculas del CPH clase I pensando que estas células (LR.4) mantuvieran niveles de hipermetilación en estos genes. Al observar que las regiones 5' de estos genes se encontraban hipermetiladas, entonces se intentó ver el efecto de la incorporación al ADN del análogo de la citidina (5-Azacitidina).

RESULTADOS:

Se muestra que con un tratamiento de 5-Azacitidina (10mM durante 3 días) es suficiente para que al digerir el ADN con enzimas sensibles a metilación (MspI) y su isoezquizómero (HapII), observar y comparar los patrones del ADN y con esto notar una disminución de las secuencias metiladas en los genes clase I en la región 5'.

Al analizar los transcritos de los genes clase I se observa que en las células tratadas con 5-Azacitidina también se incrementa la expresión del mensajero para estos genes y esta expresión se mantiene hasta 30 días después del tratamiento.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Al principio de 1960 se determinó que existían dos clases diferentes de linfocitos. Los linfocitos B, responsables directos de la respuesta inmune humoral y los linfocitos T, que median la respuesta celular (Ikuta, K., 1992).

La mayoría de los precursores de los linfocitos T son producidos en la médula ósea. Posteriormente, las células comprometidas en esta vía de diferenciación migran al timo en donde tienen lugar una serie de cambios en la expresión génica que conducen a las etapas finales de la misma (Benveniste, P., *et al.* 1990). En base a sus propiedades funcionales se les ha clasificado en dos grandes grupos: linfocitos T cooperadores (CD4+: Th0, Th1 y Th2) y linfocitos T citotóxicos (CD8+: LTC) (Monaco, J.J. 1992). El primer grupo es fundamental en la orientación y regulación de la respuesta inmune a través de la síntesis de citocinas (Openshaw, P., *et al.* 1995). La función primordial de los linfocitos T citotóxicos consiste en identificar y destruir células infectadas por virus o transformadas (Suh, W-K., *et al.* 1994). Es importante señalar que la especificidad de estas funciones no está totalmente restringida a cada una de estas poblaciones ya que es posible encontrar células CD4+ con actividad citotóxica y células CD8+ que secretan interleucinas.

Otro grupo importante de linfocitos T se diferencian fuera del timo. La función de esta población de células T está relacionada en un buen número de casos con el reconocimiento de superantígenos y la vigilancia inmunológica responsable de la eliminación de agentes infecciosos de origen bacteriano (Henderson, R.A., *et al.* 1992).

Los linfocitos B se originan y diferencian en la médula ósea. En forma similar a lo que ocurre con los linfocitos T, es posible clasificarlos en base a sus propiedades funcionales,

algunas determinadas por el tipo de inmunoglobulina que secretan, IgM, IgG etc., o por el estadio de diferenciación y funcional de las mismas, tales como: células pro o pre B, células de memoria o células plasmáticas.

Una diferencia importante entre estas dos grandes poblaciones de linfocitos, T y B, radica en la forma en que reconocen determinantes antigénicos. Los linfocitos T lo hacen a través de una de dos variedades de receptores localizados en la membrana plasmática: TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$, asociados con el complejo CD3. El reconocimiento antigénico está restringido por productos del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) que en el caso de las células CD4+ corresponde a las moléculas de clase II, en tanto que las moléculas de clase I son responsables de presentar antígenos a los linfocitos T CD8+ (ver más adelante). Los linfocitos B por el contrario, pueden reconocer al antígeno en su forma nativa mediante las inmunoglobulinas de superficie (Barber, L.D. y Parham, P., 1993).

La especificidad del reconocimiento de antígenos está determinada por la presencia de repertorios extensos de receptores de las células T o B. El origen esta diversidad está determinado genéticamente y se caracteriza, entre otras cosas, por que solo un tipo de receptor es expresado por cada clona de linfocitos en condiciones normales.

Como se discutirá más adelante, en condiciones de neoplasia o de algunas enfermedades que afectan al sistema inmune, alteraciones en la expresión de moléculas del CPH, de los co-receptores CD4 o CD8, o de las moléculas asociadas al Receptor de Células T (TCR) pueden alterar la eficiencia de los sistemas de vigilancia inmunológica.

ESTRUCTURA DE LAS MOLÉCULAS DEL CPH MURINO

Por la naturaleza experimental de este trabajo la discusión de productos del CPH del ratón (H-2) se restringirá a las moléculas de clase I y a algunas de sus interacciones con otras proteínas relevantes en la presentación de péptidos antigénicos.

Las moléculas de clase I están codificadas por genes localizados en una región del cromosoma 17 en el ratón (Hood, L., 1983). Tres de ellas, K, D y L son productos expresados en la mayoría de las células nucleadas. Otras moléculas relacionadas, agrupadas como Qa o Tla (Hood, L., *et al.* 1983; Pan-Yung, T. J. y Baldwin, S.A., 1993; Singer, D.S. y Maguire, J.E., 1990 y David-Watine, B., *et al.* 1990), tienen una distribución restringida aún cuando guardan extensa homología y propiedades funcionales con K, D y L (Pan-Yun, T.J. y Baldwin, S.A., 1993)(Figura 1).

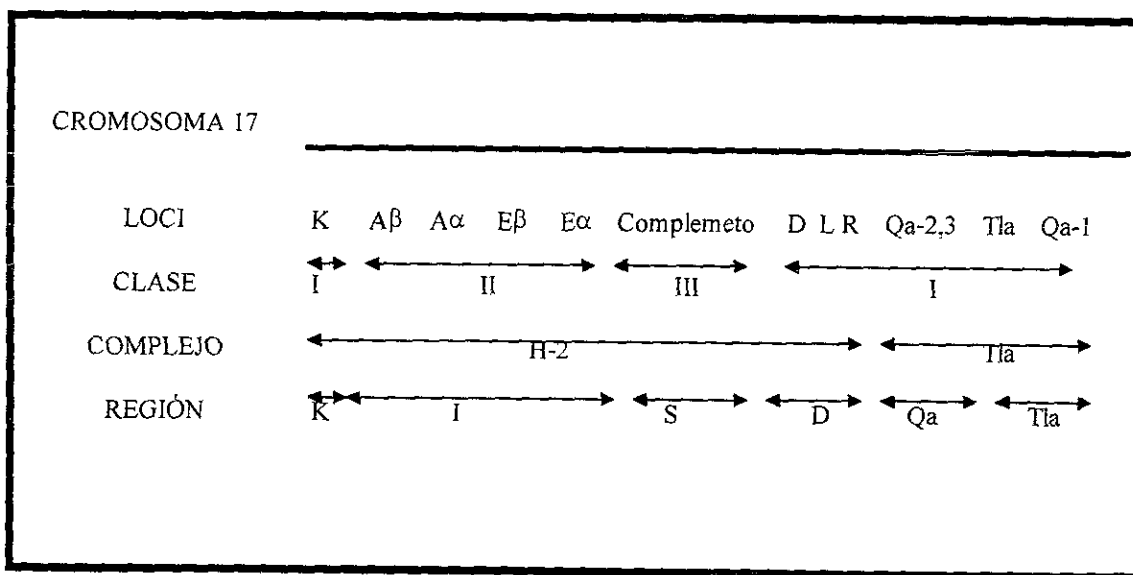


Figura 1. Mapa genético del CPH clase I murino (Hood, L., *et al.* 1983).

Las moléculas de clase I son estructuras díméricas constituidas por una cadena pesada α codificada por uno de los distintos genes localizados en el CPH y por la $\beta 2m$, una molécula de menor tamaño codificada en otra región del genoma. En un extremo de este dímero, en una

cavidad formada por la cadena pesada se encuentra un péptido derivado de la degradación de proteínas intracelulares. La presencia de estos tres componentes determina la conformación estable del complejo y su transporte adecuado a la superficie celular (Fremont, D.H., *et al.* 1992; Bjorkman, P.J., *et al.* 1987).

Cada gen de clase I esta dividido en 8 exones presentando una organización exon-intron característica. El primer exon codifica la secuencia lider. Los exones II-IV codifican para los dominios extracelulares (α_1 , α_2 y α_3). El exon V para dominio transmembranal, mientras que la región intra-citoplásmica y la región 3'NT están codificados por los exones VI-VIII (Figura 2)(Bjorkman, P. y Parham, P., 1990).

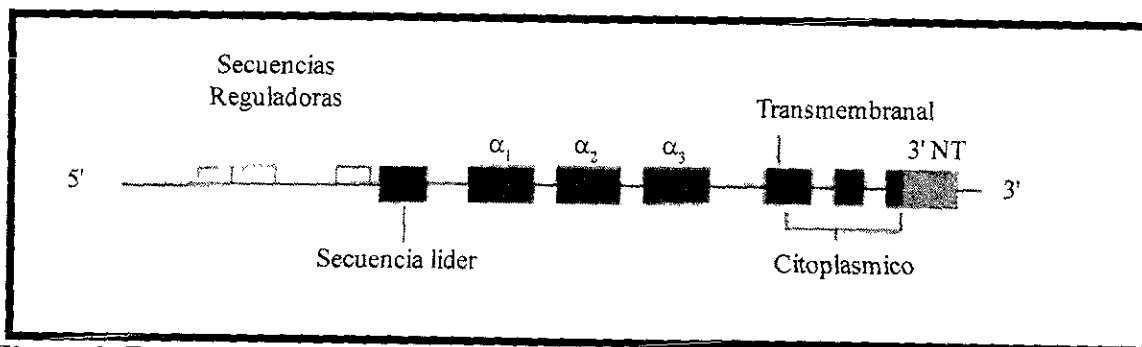


Figura 2. Estructura exon -intron de los genes del CPH clase I. (Abbas, A.K., *et al.* 1994). 3'NT: región no trasucida localizad en el extremo 3'.

A diferencia de los genes que codifican para la cadena pesada, el que codifica para la β_2m se localiza en el cromosoma 6 del ratón (Hood L., *et al.* 1983; Singer, D.S. y Maguire, J. E. 1990; David-Watine, B., *et al.* 1990). La estructura del gen consiste en 4 exones, de los cuales uno de ellos contiene la mayor parte de la información correspondiente a la proteína (Hood, L., *et al.* 1983).

Desde el punto de vista estructural se pueden reconocer varias regiones en la cadena pesada. El extremo distal está formado por los dominios α_1 y α_2 , que muestran una gran variación alélica; el dominio α_3 , muy conservado, interacciona con la β_2m ; una región transmembranal, y una cola citoplásmica (Figura 3). Los dominios α_1 y α_2 forman una

plataforma compuesta por hojas β -plegadas (donde cada dominio aporta cuatro hebras) delimitada por α hélices (Figura 4). El surco resultante corresponde al sitio de unión a péptidos derivados del procesamiento de proteínas de origen endógeno, algunos de los cuales pueden ser antigénicos (Bjorkman, P.J., *et al.* 1987). Debido a la variación alélica, el surco restringe el número de péptidos que pueden ensamblarse en cada una de las moléculas; sin embargo, esta capacidad de aceptar un número variable de péptidos permite a cada alelo presentar más de una molécula a la población de células T (Jardetsky, J.S., *et al.* 1991; Falk, K., *et al.* 1991). La interacción del dominio α_3 con la β_2m es fundamental en la conformación de las moléculas de clase I (Fremont, D.H., *et al.* 1992); sin embargo es importante señalar que algunas moléculas como H-2L^d y H-2D^b pueden llegar a la membrana sin estar asociadas a β_2m (Williams, D.B., *et al.* 1989; Sege, K., *et al.* 1981).

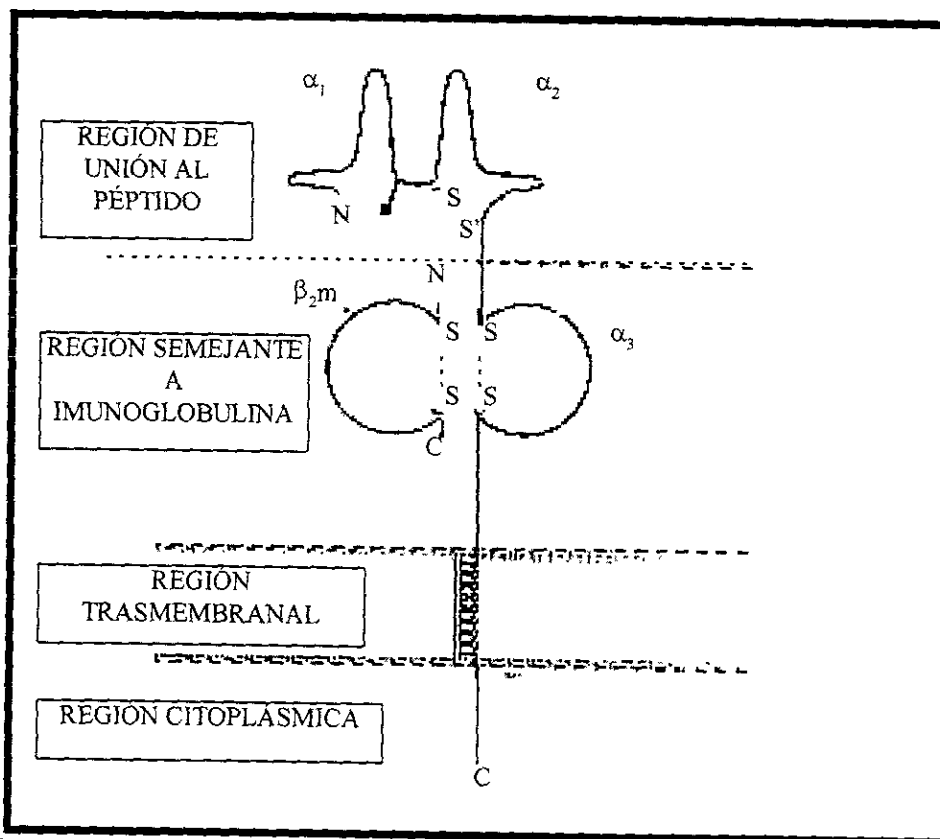


Figura 3. Diagrama esquemático de las moléculas clase I del CPH (Abbas, A.K., *et al.* 1994).

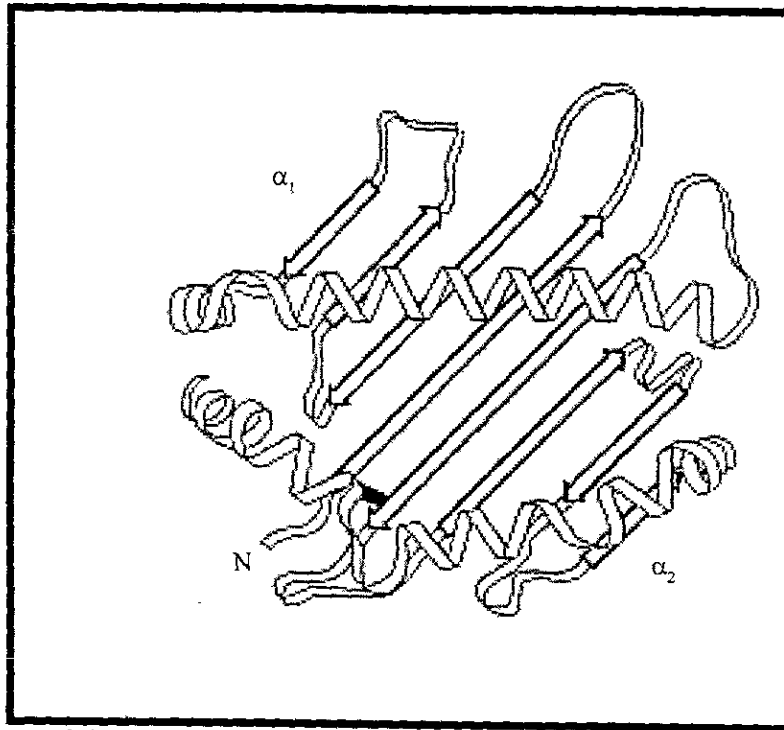


Figura 4. Patrón del doblamiento de las moléculas clase I del CPH visto de la parte superior de la molécula (Abbas, A.K., *et al.* 1994; Bjorkman, P.J. y Parham, P., 1990).

Al utilizar métodos cristalográficos, que confieren una mayor resolución en el análisis de moléculas, se demostró la existencia de compartimentos en el seno del surco de unión a péptidos. Para las moléculas clase I se definieron 6 compartimentos a los que se les denominó con las letras A-F. Los compartimentos A y F corresponden a los extremos proximal y distal del surco, son los más conservados y determinan que la cavidad esté cerrada. Como consecuencia de esta conformación el tamaño de los péptidos que pueden ser ensamblados por una molécula de clase I está limitado a 8-20 aminoácidos. Los compartimentos B, C, D y E son polimórficos y son fundamentales en la selección de péptidos (Figura 5) (Fremont, D.H., *et al.* 1992; Matsumura, M., *et al.* 1992; Engelhard, V.H., 1994).

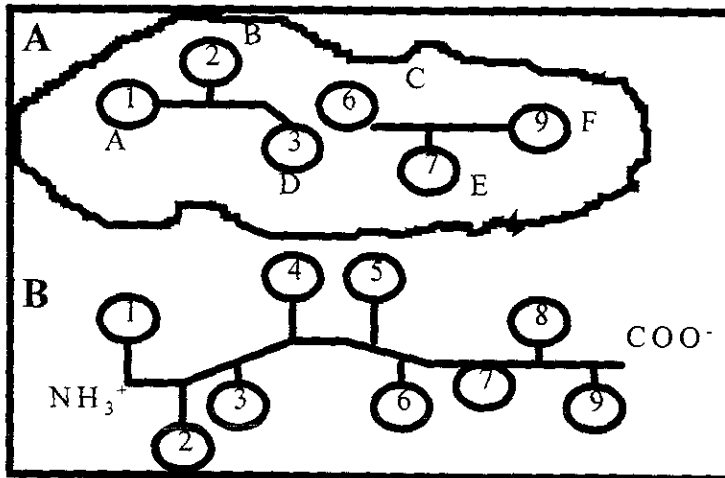


Figura 5. Interacción del péptido con moléculas clase I. A) representación de la conformación de un péptido y localización de la cadena lateral. B) Representación esquemática de la orientación de la cadena lateral (Matsumura, M. *et al.* 1992).

Los péptidos que de manera predominante se unen a molécula clase I tienen una conformación β extendida, mientras que los que lo hacen con menor frecuencia tienen una conformación de α hélice (Barber, L.D. y Parham, P. 1993). La conformación β extendida permite un mayor número de puentes de hidrógeno entre el surco y la cadena principal de los péptidos, mientras que las conformaciones de α hélice el número de interacciones se ve muy reducido (Fremont, D.H., *et al.* 1992). Sin embargo, en ambas conformaciones se sigue manteniendo la misma orientación debido a que las interacciones del péptido con las cavidades A y F que permiten una unión específica y de alta energía (Figura 6) (Matsumura, M., *et al.* 1992). Los extremos amino y carboxilo terminal de los péptidos interactúan con cavidades localizadas en los extremos del surco de unión de la molécula clase I. La unión entre ellos es fuerte, muy estable e involucra primeramente a los átomos que forman las cadenas laterales de las proteínas clase I y la cadena principal de átomos del péptido antigénico (Parham, P. 1992, Barinaga, M. 1992). La interacción a este nivel se logra por la formación de puentes de hidrógeno entre los sitios A y F que son los sitios de unión de alta afinidad. Se ha demostrado que la adición o delección de aminoácidos en el extremo amino o en el extremo carboxilo del péptido disminuye la eficiencia de la unión con la molécula de clase I. También se determinó que para la unión de alta afinidad es más importante la

inserción del extremo amino del péptido en el compartimento A, que la del extremo carboxilo en el compartimento F (Fremont, D.H., *et al.* 1992; Barber, L.D. y Parham, P. 1993). Cuando los péptidos son de gran tamaño, el péptido ancla sus extremos terminales en la cavidad A y en la cavidad F quedando la parte central del péptido abultada y expuesta directamente a las interacciones con el receptor de células T (Figura 7A) (Parham, P. 1992; Matsumura, M., *et al.* 1992). En la parte central del péptido, donde el contacto con las moléculas clase I es menor, la interacción se estabilizan mediante moléculas de agua que hacen puentes de hidrógeno con los antígenos péptidicos (Barber, L.D. y Parham, P. 1993).

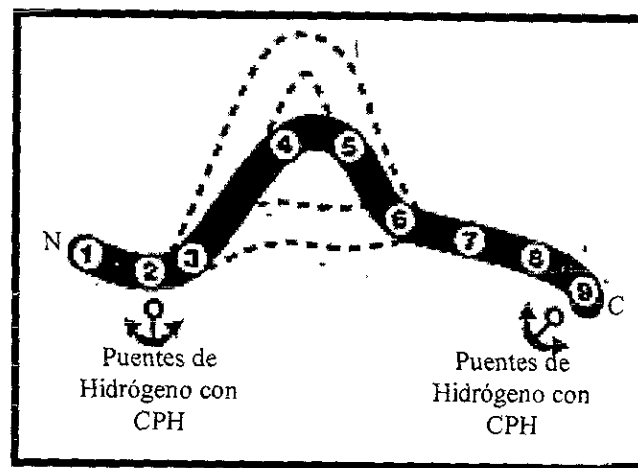


Figura 6. Diagrama de la conformación de un péptido noamético en el sitio de unión de las moléculas del CPH. En líneas punteadas se muestra el abultamiento hipotético de los péptidos de mayor tamaño que se unen a moléculas del CPH clase I (Parham, P. 1992).

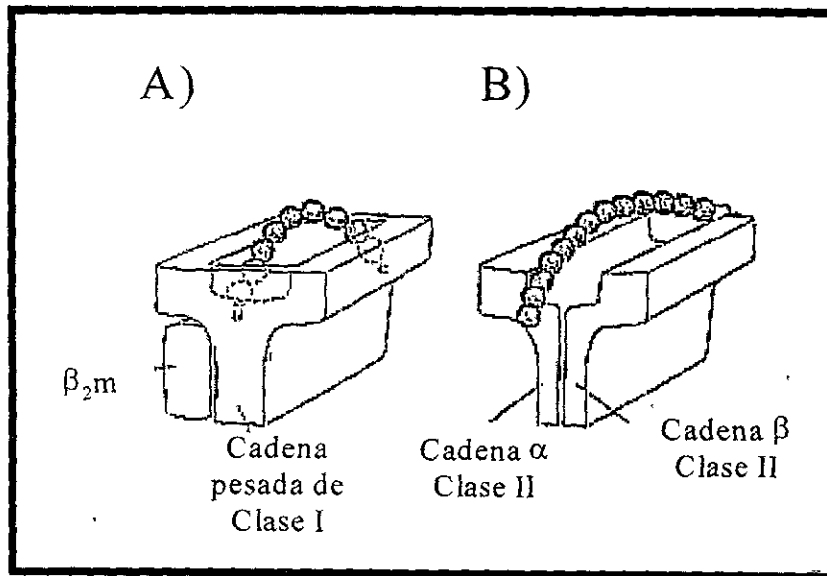


Figura 7. Representación esquemática de: A) un péptido noamérico ocupando el sitio de unión a moléculas clase I del CPH y B) un péptido de 15 residuos ocupando el sitio de unión de moléculas clase II del CPH (Barber, L.D. y Parham, P, 1993).

Como comentario es importante mencionar que los péptidos que se unen a moléculas clase II son de mayor longitud (12-22 aminoácidos), lo hacen en una conformación extendida, de manera que los extremos amino y carboxilo no sirven de anclaje lo que permite que el péptido se extienda hacia afuera por ambos lados del surco de unión (Figura 7B) (Barber, L.D. y Parham, P. 1993). El que las moléculas clase II presente cadenas α y β separadas (Figura 8) permite la unión de péptidos de mayor tamaño, donde una sola unión del residuo peptídico antigénico con un residuo de CPH clase II es importante y no se requieren de otro tipo de interacciones de alta afinidad (Matsumura, M., *et al.* 1992).

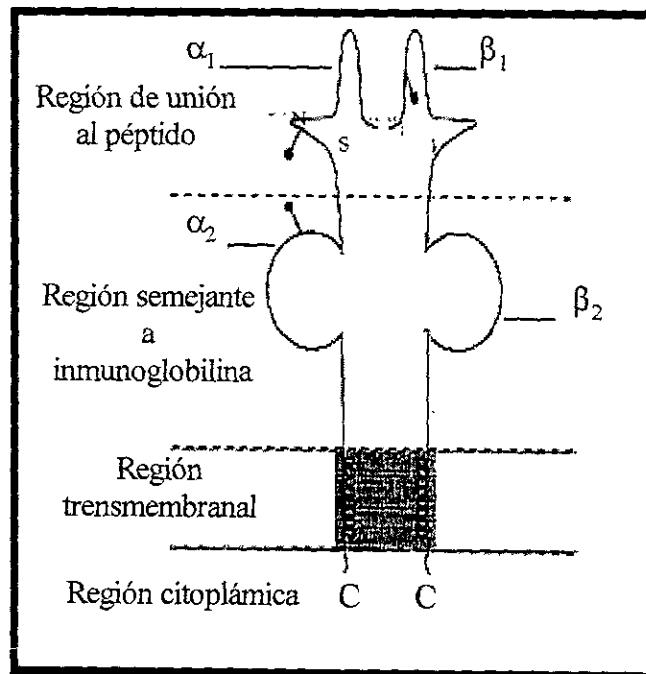


Figura 8. Diagrama esquemático de las moléculas clase II del CPH (Abbas, A.K., et al, 1994).

SÍNTESIS Y ENSAMBLE DE PÉPTIDOS A MOLÉCULAS DE CLASE I

La mayoría de los péptidos ensamblados en moléculas de clase I son productos de degradación de proteínas intracelulares. Aquellos que tienen propiedades antigénicas provienen de proteínas portadoras de mutaciones, con cambios post-traduccionales o bien codificadas por un genoma extraño, i.e. virus (Henderson, R.A., *et al.* 1992; Suh, W-K., *et al.* 1994).

Para la degradación es importante que las proteínas sean modificadas por el polipéptido ubiquitina en el extremo amino terminal. La ubiquitina actúa como una señal que facilita el reconocimiento por el proteasoma o complejo multicatalítico (Figura 9). Esta estructura se encuentra conformada por un número variable de subunidades (20-30) y sus actividades enzimáticas le confieren un papel central en las reacciones de depuración de la célula (Monaco, J. 1993). Es importante señalar que al menos dos subunidades están

codificadas en el seno del CPH (**LMP: Low Molecular mass Polipeptid Complex**); sin embargo, la inducción de mutaciones en estos genes no altera sus propiedades funcionales (Figura 10) (Monaco, J.J. 1993)

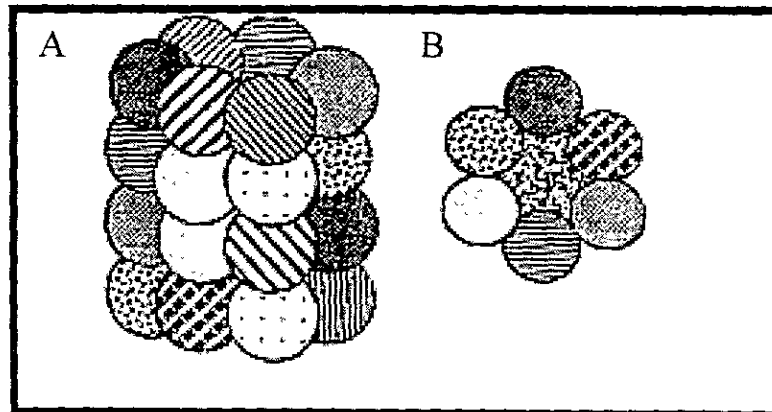


Figura 9. Representación esquemática estructural del complejo multicatalítico, modelo basado en datos obtenidos por microscopía electrónica . Compuesto de 4 anillos donde cada uno contiene 6 unidades que rodean un canal central. A) vista de frente; B) vista de la parte superior (Orlowski, M. 1990).

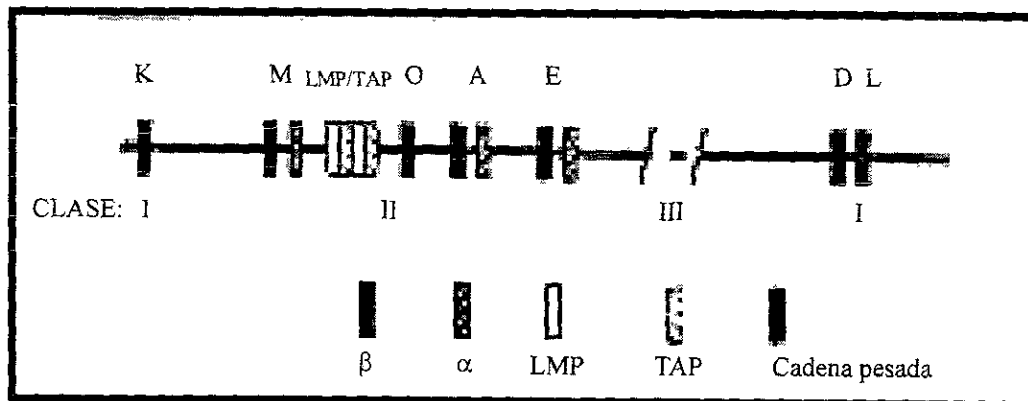


Figura 10. Representación esquemática de la organización genética del CPH (Germain, R.N., 1994).

Algunos de los productos de degradación de proteínas por el proteasoma son transportados y ensamblados en moléculas de clase I. Para que esto sea posible es necesario que se cumplan una serie de reacciones que descritas esquemáticamente permiten que: (a) las proteínas sean degradadas en péptidos que tengan la longitud y secuencia apropiadas para ser ensamblados en el surco de las moléculas de clase I (Henderson, R.A., *et al.* 1992); (b) los

péptidos resultantes deben ser transportados al RE por medio de moléculas localizadas en la membrana del mismo conocidas como Proteínas transportadoras de antígenos peptídicos (TAP₁ y TAP₂) (Neefjes, J.J., *et al.* 1993). Estas moléculas son complejos heterodiméricos pertenecientes a la familia de transportadores ABC (Higgins, C.F., 1992F). Alteraciones genéticas en uno de los genes conduce a la expresión de moléculas vacías (sin péptido) en la superficie que no son reconocidas por anticuerpos monoclonales o LTC específicos y (c) en el seno del RE se lleva a cabo el ensamble en presencia de calnexina, una molécula que actúa como chaperona (Figura 11) (Jackson, M.R. *et al.* 1994; Suh, W-K., *et al.* 1994; Jackson, M.R., *et al.* 1993).

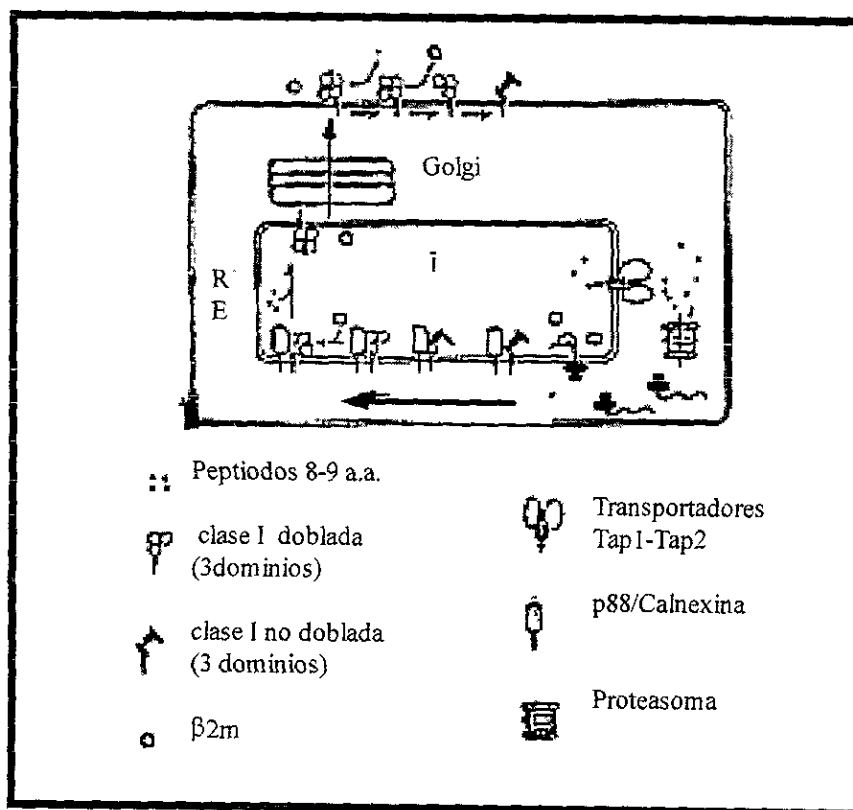


Figura 11. Representación esquemática del ensamblaje y transporte de las moléculas clase I del CPH (Jackson, M.R. y Peterson, P.A. 1993).

CAPÍTULO II
DEFICIENCIAS O DEFECTOS IMPORTANTES
PARA LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS
CLASE I DEL CPH

CAPÍTULO II

DEFICIENCIAS O DEFECTOS IMPORTANTES PARA LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS CLASE I DEL CPH

DEFICIENCIA EN $\beta 2m$

La mayor parte de la evidencia experimental ha relevado que la unión entre la cadena α y la $\beta 2m$ es indispensable para la conformación apropiada y en el ensamble en la membrana plasmática. Sin embargo, tanto en condiciones normales como en células portadoras de mutaciones en $\beta 2m$ se han detectado cadenas α en la membrana (Elliot, T., *et al.* 1992). En esos casos, sin embargo, las características moleculares son atípicas y no son reconocidas por anticuerpos monoclonales o LTC específicos (Smith, M.H. y Barber, B.H. 1990). Por otro lado, debido a los cambios conformacionales la unión de péptidos no es eficiente, pero puede ser detectada (Suh, W.K., *et al.* 1994, Jackson, M.R., *et al.* 1993).

DEFICIENCIAS EN GENES TAP

Los péptidos que se unen a moléculas clase I del CPH provienen de proteínas degradadas en el citosol (Morrison, L.A., *et al.* 1986; Moore, M.W., *et al.* 1988; Hunt, D.F., *et al.* 1992; Goldberg, A.L. y Rock, K.L. 1992) y son transportados al lumen del retículo endoplásmico (RE) por medio de un heterodímero TAP1-TAP2 (Yewdell, J.W. y Bennink, J.R., 1992). La proteína heterodimérica está formada por dos polipéptidos homólogos codificados por los genes TAP1 y TAP2 que se localizan en la región del CPH clase II (Bahram, S., *et al.* 1991; Beck, S., *et al.* 1992; Monaco, J.J., 1992).

CAPÍTULO III

METILACIÓN

La regulación de la expresión de genes en eucariontes se logra mediante un gran número de mecanismos y a diferentes niveles. Uno de los factores importantes en este proceso es la metilación de los residuos de citosina en la región 5'. Esta modificación se presenta casi exclusivamente en las secuencias que contienen CpG (citosinas unidas a guanina por medio de un enlace fosfodiéster). Secuencias con estas características se encuentran en el ADN de todas las células de los mamíferos, con una distribución no aleatoria en el genoma, sino en pequeños cúmulos localizados en regiones específicas, que se conocen como Islas CpG. (Jones, P.A. y Buckley, J.D. 1990).

La metilación es una consecuencia del reconocimiento de secuencias específicas por la enzima ADN-metiltransferasa, que transfiere un grupo metilo obtenido del donador S-Adenosil metionina (SAM) a residuos de citosina o adenina (Posfai, J. *et al.* 1989). La nomenclatura de los residuos metilados se basa en la posición del carbono o grupo amino donde se adiciona el grupo metilo, luego se agrega la palabra metil y finalmente la base que lo recibió. Generalmente se pueden distinguir 3 tipos de ADN -metiltransferasas: las que metilan el carbono 5 de la citosina, aquellas que metilan el nitrógeno del carbono 4 de la citosina o aquellas que metilan el nitrógeno del carbono 6 de la adenina; lo que permite que las bases metiladas sean: 5-metilcitosina (5mC), 4-N-metilcitosina (4NmC), 6-metiladenina (6NmA) o 6-metilcitosina (6NmC) (Lauster, R., *et al.* 1989). El ADN de la mayoría de los organismos contiene una o más bases metiladas. En los vertebrados del 3 al 6 % del ADN muestra 5mC, pero este valor disminuye conforme se desciende en la escala evolutiva, de manera que los insectos y los eucariontes unicelulares presentan niveles poco detectables de 5mC. En contraste, la plantas tiene un 30% de sus citosinas metiladas (Adams, R.L.P. 1990). Las

bacterias tienen como blancos de metilación tanto la adenina como la citosina (Bestor, T., *et al.* 1988).

Las regiones que contienen 5mC pueden ser identificadas por medio de dos técnicas. La primera consiste en la utilización de enzimas de restricción que permitan discriminar entre secuencias CpG metiladas o no. El segundo método consiste en la secuenciación del genoma; esta técnica por su naturaleza química, es capaz de distinguir residuos de citosina metilados y no metilados. Al utilizar cualquiera de estas técnicas se demostró que existe una relación inversa entre la metilación del ADN y la expresión de un gen determinado. De manera que casi todos los genes específicos de un tejido son activos, están desmetilados. Por el contrario, estos mismos genes se encuentran metilados en tipos celulares diferentes en donde su expresión no es requerida (Cedar, H. y Razin A. 1990).

FUNCIÓN DE LA METILACIÓN

La metilación de secuencias del ADN afecta la transcripción de genes, principalmente por la alteración de la interacción de ADN-proteína, lo que se refleja como un cambio conformacional en la cromatina (Jones, P.A. y Buckley, J.D. 1990).

En la mayoría de los genes de células eucariontes superiores la 5mC generalmente se encuentra incluida en la secuencia reguladora que actúa en *cis* ó en alguna región del gen donde pueda modular la transcripción, de manera que pueda prevenir la unión de factores que actúan en *cis* (Stallings, R. L., *et al.* 1989; Cedar, H. y Razin A. 1990). Sin embargo, para los genes del CPH clase I se ha reportado que estos pueden expresarse tanto en ADN hipometilado como en hipermetilado (Le Bouteiller, P. 1994). Estas diferencias aún no se han aclarado, ya que los distintos resultados que se han reportado se deben a la localización de las

regiones que se han analizado y se ha visto que las variaciones observadas dependen del tipo celular estudiado.

La interferencia de la metilación de la citosina para la regulación de la expresión de genes es más importante cuando las secuencias metiladas se encuentran en la región 5' que en la región 3' (Eden, S. y Cedar, H. 1994; Singer, D.S. y Maguire, J.E. 1990). Se han propuesto dominios hipometilados localizados en la región 5' del gen expresado, mientras que la hipermetilación puede darse en la región 3' no traducida (Singer, D.H. y Maguire, J. 1990).

Para poder explicar la relación que existe entre la metilación de las islas CpG y la represión transcripcional se han propuesto dos modelos:

1) Modelo directo: postula que para que se reprima la transcripción los factores transcripcionales deben, al momento de unirse al ADN, reconocer a una isla CpG metilada como equivalente a una mutación. Inicialmente se propuso este modelo debido a la gran cantidad de factores transcripcionales descritos, muchos de los cuales parecen ser sensibles a la metilación. Sin embargo, se ha demostrado que este modelo de inhibición de la transcripción solo tienen un efecto mínimo en la misma (Boyes, J. y Bird, A. 1991).

2) Modelo indirecto: esta propuesta se basa en la existencia de proteínas nucleares con capacidad de unirse al ADN metilado. La unión de estas proteínas al ADN inhibe la interacción con los factores transcripcionales. En este modelo las proteínas nucleares actúan como inhibidores secundarios, ya que el primario es la metilación del ADN (Boyes, J. y Bird, A. 1991).

La presencia de proteínas que interactúen con ADN metilado se ha demostrado en base a lo siguiente:

(a) La proteína MDBP2 fue identificada en asociación con la histona H1 (Tate, P. y Bird, A., 1993). La unión a sitios metilados no era clara ya que esta molécula puede unirse también a secuencias TpG y en consecuencia su relevancia en la regulación de la transcripción no pudo ser determinada con precisión. Una prueba convincente de su papel fue obtenida al encontrarse unida al ADN metilado en la región promotora del gen de la vitelogenina de gallina (Campoy, F.J., *et al.* 1995; Santoro, R., *et al.* 1995; Strom, R., *et al.* 1995).

(b) Otra proteína de unión a ADN metilado es MeCP-1. Esta proteína se une al menos a 15 dinucleótidos 5-CpG (donde la citosina es 5-mC). La consecuencia de esta unión es la inhibición de la transcripción (Boyes, J. y Bird, A. 1991). Existe una correlación entre la afinidad de MeCP-1 y el grado de inhibición de la transcripción. Se sabe que MeCP-1 tiene la capacidad de inhibir la transcripción tanto *in vitro* como *in vivo*. Las funciones que parece llevar a cabo MeCP-1 al unirse al ADN metilado son: mantener inaccesible el ADN a la degradación por ADNasas y la inactivación del gen mediado por la unión de MeCP-1 a islas CpG metiladas localizadas en la región promotora (Boyes, J. y Bird, A. 1991). El grado de inactivación del gen depende del número de 5-mCpG. Cuando el número de CpG metilados es bajo, la inhibición del transcrito es aún baja y se puede inducir la expresión del transcrito en presencia de activadores fuertes en *trans*. Por el contrario, en genes con una alta densidad de CpG metilados la inactivación génica es estable (Boyes, J. y Bird, A. 1991).

(c) Existe otra proteína nuclear semejante a MeCP-1 llamada MeCP-2, que se une al ADN cuando las islas CpG están metiladas. La localización de MeCP-2 es dispersa a través de todo el genoma, tal y como ocurre con los sitios de ADN metilados. En base a la secuencia de aminoácidos se considera una proteína básica (rica en: lisina y arginina, prolina y serina) que presenta una secuencia específica con capacidad de interactuar con el surco menor del ADN de forma B. El segundo grupo de aminoácidos que contiene pertenecen al consenso SPKK (serina, prolina, lisina, lisina), lo que permite su unión al surco menor del ADN en la zona rica en AT (adenina-timina). Estas estructuras de unión al surco menor del ADN son

inesperadas, ya que en el surco mayor se localizan las base metiladas. Hasta ahora no se sabe si la presencia de estas secuencias es importante para la especificidad de unión de MeCP-2 al ADN metilado. Se ha propuesto que una de las funciones de MeCP-2 es la capacidad de descompactar la cromatina cuando el ADN está metilado (Lewis, J. D., *et al.* 1992).

Las diferencias entre MeCP-1 y MeCP-2 se relacionan con la especificidad con que se unen al ADN metilado. MeCP-1 requiere al menos 12 CpG metiladas para formar un complejo, mientras que MeCP-2 se une a 1 CpG metilado. La unión de estas proteínas al ADN hemimetilado es débil comparado con la unión a ADN metilado simétricamente (Lewis, J. D., *et al.* 1992).

El descubrimiento de proteínas que se unen a ADN metilado da la posibilidad de que tales proteínas sean las responsables de los efectos biológicos de la metilación. A nivel molecular los efectos más obvios son la estructura de la cromatina y la transcripción (Lewis, J. D., *et al.* 1992).

DEAMINACIÓN DE LA CITOSINA Y 5-METILCITOSINA

Los residuos de citosina de los pares de dinucleótidos CpG sufren mutaciones en una proporción elevada si se compara con las mutaciones que tienen lugar en otras bases. Estas mutaciones incluyen tanto residuos dentro como fuera de la secuencia blanco para la metilación del ADN . Los altos índices de mutación se deben a la transición de citosina a timina. En general se presupone que la transición a timina es una consecuencia de la deaminación de la citosina en el carbono -4. La citosina no metilada también puede sufrir una deaminación y su transición es a uracilo, en lugar de a timina (Wysynski, M., *et al.* 1994; Laird, P. W. 1996).

La transición de citosina a timina cuando el residuo de citosina no está metilado es mucho menor que cuando la citosina está metilada. Sin embargo, el índice de transición no es suficiente para explicar la presencia de un 40% de mutaciones cuando existe una deaminación de la 5-mC. Estas diferencias se atribuyen principalmente a que existe un mecanismo de reparación más eficiente cuando se trata de la presencia del uracilo en una hebra de ADN, de manera que el uracilo, es reconocido y removido de manera preferencial, ya que el ADN no presenta uracilo como base pirimídica, mientras que la deaminación de 5-metilcitosina genera timina, la cual no es corregida (Figura 12)(Razin, A. y Riggs, A.D. 1980). La reparación por la excisión de residuos de uracilo incorporados al ADN es realizada por la acción de la ADN-glicosidasa del uracilo. Además de esta enzima existe la ADN glicosidasa que se dedica a la remoción de bases (uracilo y timina) cuando esas presentan como par a la guanosina (Neddermann, P. y Jirieny, J., 1994).

último tiene la capacidad de inducir la transformación celular y ser un agente hipometilante, capaz de activar la expresión de algunos genes que pueden estar silenciados por la metilación. Independientemente de sus características químicas, todos los agentes hipometilantes son tóxicos para las células.

La 5-Aza es un análogo de la citidina y a diferencia de esta última, posee un átomo de nitrógeno en lugar de uno de carbono en la posición 5 (Figura 13). Por tal razón la acción metilante de la ADN-metiltransferasa es inhibida por cuestiones estéricas. El mecanismo de inhibición involucra la formación de un enlace covalente entre el nucleófilo de la enzima catalítica y la posición del carbono 6 reactivo de la 5-Aza, la cual es reemplazada por la citosina en los sitios de metilación (Santi, D.V., *et al.* 1984; Razin, A. y Riggs, A.D. 1980).

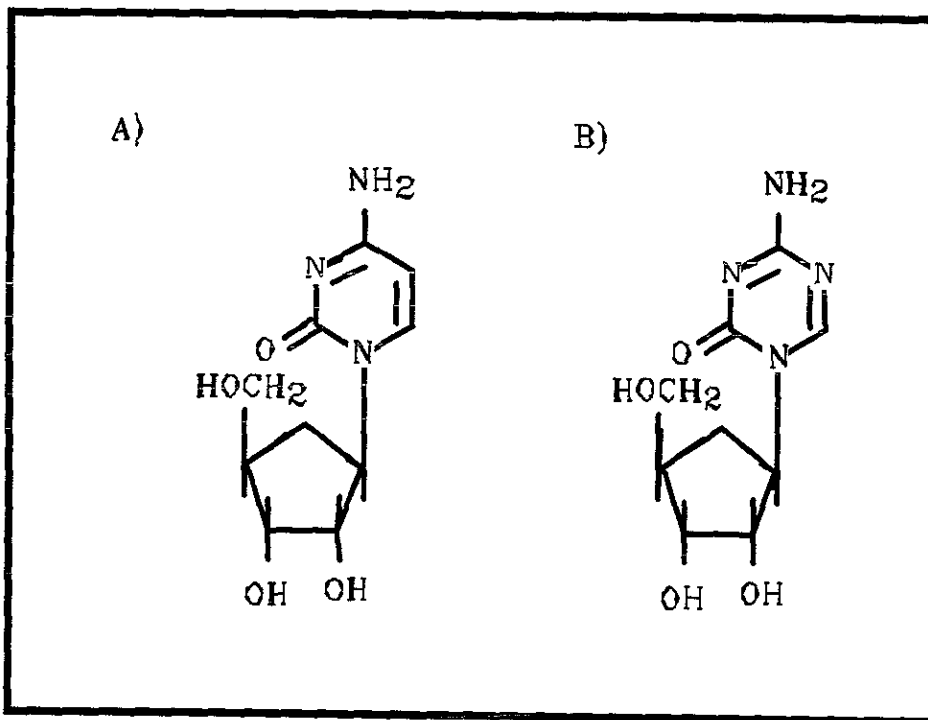


Figura 13. Estructura química de la A) Citidina y B) 5-Azaciditina..

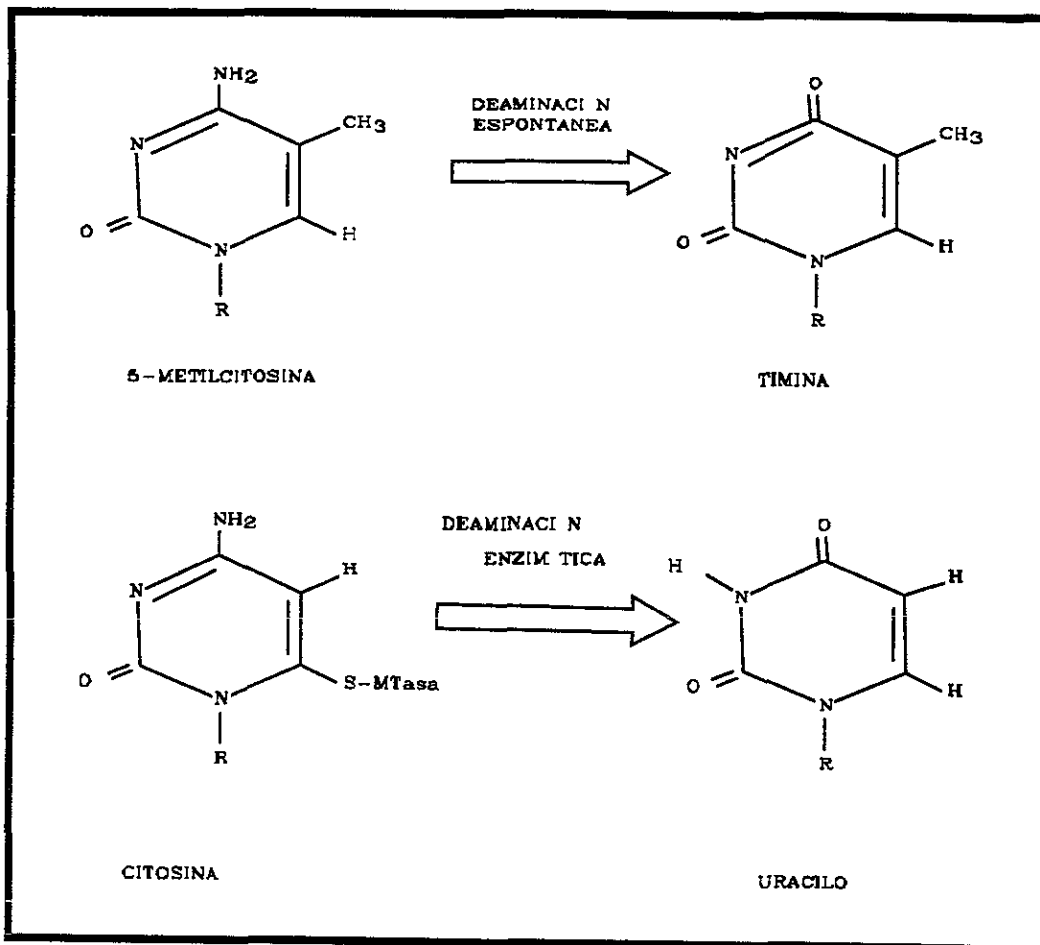


Figura 12. Muestra las reacciones de deaminación que puede sufrir la citosina así como la 5-metilcitosina (Laird, P. W. 1996).

AGENTES HIPOMETILANTES

Desde hace varios años se tiene evidencia de que la carcinogénesis química puede interferir con sistemas de metilación del ADN (Riggs, A.D. y Jones, 1983).

Dentro de los carcinógenos químicos utilizados *in vitro* como agentes hipometilantes se encuentran: ésteres de forból (PMA), etil-metil-sulfonato (EMS), N-metil-N'-nitro-N-Nitrosoguanidina (NTG) y la 5-Azacidina (5-Aza). Este último

FALTA PAGINA

No. 25 y 26

CAPÍTULO IV
ANTECEDENTES - OBJETIVOS

CAPÍTULO IV

ANTECEDENTES - OBJETIVOS

HIPÓTESIS

ANTECEDENTES

En base a los reportes que existen de la relación que hay entre la metilación y la inactivación de genes y pensando en que ésta pueda ser una de las pautas que nos lleve al conocimiento más específico de la línea de células LR.4 (H-2⁷), se pensó que estos genes pudieran estar hipometilados, por lo que el presente trabajo tiene la finalidad de estudiar los niveles de metilación en células tumorales murinas LR.4 derivada de la cepa murina DBA/2.

Este trabajo de investigación se orienta al estudio de niveles de metilación en una línea celular tumoral (LR.4) y tendrán como base los experimentos realizados por Nava, G. y colaboradores (1992).

El que LR.4 no expresara transcrito de estos genes nos llamó la atención y retomando datos de la bibliografía, se decidió investigar el nivel de metilación del ADN de la línea celular LR.4, así como el papel de la metilación en la expresión de moléculas clase I del CPH debido a que existen artículos en los cuales se demuestra que existe una relación entre metilación e inactivación del gen y la relación inversa, hipometilación y activación, aunque también existen excepciones a esta regla.

Para determinar si la metilación es el único factor involucrado en la ausencia de transcrito de los genes del CPH clase I, las células LR.4 fueron tratadas con 5-Azacitidina, la cual se caracteriza por ser un agente químico hipometilante y se observó la tolerancia que tienen estas células a este tratamiento químico.

OBJETIVOS GENERALES:

Este trabajo tiene como finalidad:

- a) Estudiar los niveles de metilación en células tumorales murinas de la línea celular LR.4. y compararlos con los niveles de metilación de un tejido normal de la cepa DBA/2.
- b) Estudio a nivel molecular del efecto de la 5-Azacitidina en una línea tumoral murina LR.4
- c) Determinar si la metilación es el único factor involucrado en la ausencia de transcrito para genes del CPH clase I en la línea celular LR.4.

HIPÓTESIS

Pensando que existe una relación directa entre la ausencia de transcritos de los genes del CPH clase I e hipermetilación de estos mismos en la línea LR.4 al tratar estas células con un agente hipometilante análogo de la citidina (5-Azacitidina) e incorporarse al genoma de estas células, podremos observar una modificación en los niveles de metilación.

Si el tratamiento con 5-Azacitidina modifica los niveles de metilación en las células tratada, entonces esperamos poder inducir la expresión transcripcional de estos genes sin alterar la viabilidad celular, debido a que este agente hipometilante es altamente tóxico.

CAPÍTULO V
MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO V

MATERIALES Y MÉTODOS

CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTO CON 5-Azacitidina

LÍNEA CELULAR

Se utilizó la línea celular tumoral murina LR.4 derivada de L5178Y (Nava, G., *et al.* 1992). LR.4 fue aislada por su capacidad de crecer a través de barreras alogénicas. La caracterización inmunológica reveló por citometría de flujo que no expresa CD4, CD8, CD25 y moléculas clase I del CPH in vitro e in vivo (Verástegui, E., *et al.* 1997). El análisis genético mostró que LR.4 es portadora de distintas alteraciones que se manifiestan por la ausencia de ARNm específicos: (a) deleciones en β_2m e IA_β ; (b) extensa metilación de los genes de clase I, y (c) arreglos no productivos en la subunidad α del Receptor de células T (TCR). La causas responsables de la ausencia de transcritos para IA_α , IE_α e IE_β no han sido determinadas (Nava, G., *et al.* 1992).

CEPAS MURINAS

Se utilizaron ratones hembras de 4 y 8 semanas de las estirpes endogámicas C57BL/6J (H-2^b) y DBA/2 (H-2^d) para crecer intra-peritonealmente la línea celular LR.4. Como controles se usaron ratones DBA/2 vírgenes. Los animales fueron criados en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. y usados posteriormente en el vivario del Instituto Nacional de Cancerología.

PROPAGACIÓN Y CRECIMIENTO DE LR.4

LR.4 fue propagada *in vivo* en la cavidad peritoneal usando inóculos que variaron entre 10^4 y 10^6 células por ratón.

Las células se cultivaron *in vitro* en medio RPMI 1640 suplementado con: 10% Suero Fetal Bovino, 1mM L-glutamina, 1% de aminoácidos esenciales, 1mM Piruvato de Sodio, 2mM glutamina, 1% fungizona y 100 mg/ml estreptomina (Todos obtenidos de Gibco). Las condiciones de cultivo fueron: 37 °C y una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂.

TRATAMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR LR.4 CON 5-Azacitidina

Se trataron 1×10^5 células/ml de la línea LR.4 con 10 mM de 5-Azacitidina durante 3 días. Al tercer día fueron lavadas con 6 ml de medio Dulbecco sin suero y con antibióticos, centrifugadas durante 5 minutos a 1200 rpm y resuspendidas en RPMI 1640 suplementado.

A partir de este momento el medio fue cambiado cada tercer día. A los 7 y 30 días después del tratamiento se tomaron células para analizar los cambios inducidos por el tratamiento con 5-Azacitidina (a nivel de ADN y ARN).

ANÁLISIS DE ADN

PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO

Para la purificación de ADN extraído de la línea celular LR.4 o del bazo de ratones DBA/2 se utilizó la técnica descrita por Sambrook, J., *et al.* (1989). Este procedimiento consistió en: (a) incubar las células o el tejido durante 90 min. en una solución de extracción (10 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 M EDTA pH 8, 20 mg/ml ARNasa pancreática en 10mM Tris

pH 7.5 y 15 mM NaCl, 0.5% SDS). Posteriormente se adicionó Proteinasa K 0.1mg/ml y la mezcla de reacción se incubó por 18 h a 50 °C. Subsecuentemente se efectuaron dos extracciones con fenol saturado con 0.1 M Tris pH=7.8 y 0.1% 8-Hidroxiquinolina seguida de una extracción final con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (50:49:1).

ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN Y DIGESTIÓN DE ADN

En general, las muestras de ADN (30 µg) fueron digeridas con 1 unidad/µg de enzimas de restricción que reconocieran 6 nucleótidos y que en su mayoría fueran C y G (EcoRI o KpnI). Aprovechando las características del mapa de restricción, la búsqueda de alteraciones en el gene de la B₂-m fue analizada con BamHI.

Para establecer los sitios de metilación de los genes clase I se utilizaron dos enzimas: la primera es una enzima de restricción (MspI) que efectúa corte sobre la cadena en las secuencias -CCGG- independientemente de que la citosina se encuentre o no metilada. La segunda enzima de restricción (HapII) reconoce la misma secuencia -CCGG-, pero únicamente realiza su corte si no se encuentra metilada la citosina (Laboratorios Amersham International Aylesbury, U.K.).

La digestión del ADN se hizo según la metodología descrita por Sambrook, J. y colaboradores (1989) utilizando las siguientes endonucleasas: Bam HI, Eco RI, Hap II, Kpn I y Msp I.

PROPIEDADES DE LAS ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN USADAS EN ESTE TRABAJO

*BamHI: 5'-G/GATCC-3'. Obtenida de *Bacillus amyloliquefaciens*.

*EcoRI: 5'-G/AATTC-3'. No corta cuando 3'A o C es N6 metiladenina o 5-metilcitosina. Obtenida de *Escherichia coli* RY13.

*HapII: 5'-C/CGG-3'. No corta si 3'C es 5-metilcitosina o cualquier C es 4-metilcitosina. Obtenida de *Haemophilus parainfluenzae*.

*KpnI: 5'-GGTAC/C-3'. No corta cuando 3' es 5-metilcitosina. Obtenida de una cepa de *Klebsiella pneumoniae*.

*MspI: 5'-C/CGG-3'. No corta si 5'C es 5-metilcitosina pero corta cuando 3'C es 5-metilcitosina. Obtenida de *Moraxella* sp. 3416.

ELECTROFORESIS

Después de la digestión enzimática del ADN se agregó a cada mezcla de reacción buffer de muestra a una concentración final de 10% (0.25% Azul de Bromofenol, Eastman Kodak Co., 0.25% Xilen-cianol, Sigma Chemical Co., 15% Ficoll tipo 400, Pharmacia Fine Chemicals) y se corrieron en un gel de agarosa 0.8% con 0.01% Bromuro de Etidio (10 mg/ml, Sigma Chemical Co.). El experimento se realizó en una cámara BRL Modelo H5 (Bethesda Research Laboratories, Life Technologies, Inc.) a 20 volts (Fuente de poder: Bio-Rad, modelo 250/2.5) en Buffer TBE 1x [Stock TBE 5x: 0.45 M Tris (Merck), 0.45 M Ácido Bórico (Merck) y 20ml EDTA 0.5 M pH=8 (Sigma)].

DESNATURALIZACIÓN Y TRANSFERENCIA DEL ADN A UNA MEMBRANA

El ADN fue desnaturalizado durante 1 hr. [1.5 M Cloruro de Sodio (NaCl) (J.T. Baker), 0.5N Hidróxido de Sodio en lentejas (NaOH) (MERK)], seguido de una incubación en solución neutralizante [1 M Tris-HCl pH 7.4, 1.5 NaCl] (Sambrook, J., *et al.* 1989).

Posteriormente las muestras de ADN fueron transferidas por capilaridad a una membrana de nitrocelulosa reforzada con nylon (Sambrook, J., *et al.* 1989) utilizando una solución de SSC 10x.

Terminada la transferencia, la membrana de nitrocelulosa reforzada con nylon, se horneó a 80°C por 2 horas con el fin de fijar en ella las muestras de ADN (Thomas, P. 1980).

ANÁLISIS DE ARN

PURIFICACIÓN DE ARN

En la purificación de ARN de la línea celular LR.4 y del bazo de DBA/2 se utilizó la técnica descrita por Chomozynski y Sacchi (1987) que consiste en la utilización de Tiocianato de Guanidina Ácido-Fenol-Cloroformo (4M Tiocianato de Guanidina (Sigma Chemical Co.), 0.025M Citrato de Sodio pH 7 (Merck), 0.5% Sarcosil (Sigma Chemical Co.) y 0.1M 2-Mercaptoetanol (Sigma, Chemical Co.), seguido de extracciones con fenol (Boehringer Manhaime) saturado con 0.1M Tris pH 7.8 (Sigma Chemical Co.), 0.1% 8-Hidroxiquinolina (Aldrich Chemical Company, Inc.).

ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE

En la electroforesis se utilizaron 15 µg de ARN y se mezclaron con buffer de muestra [Sol A: 294 ml de HEPES-EDTA 10x (0.5M Ácido N- (2-hidroxietil) piperazina-N'- (2-etanosulfónico, (HEPES) USB Co.), 0.02M Ácido Etilen Diaminotetracético, (EDTA Sigma Chemical Co.)], 706 ml Agua y Buffer de formaldehído 37% formamida: 89ml formaldehído y 250 ml de formamida). Se corrieron en un gel de agarosa 1.2% (USB Co.) conteniendo 6% de formaldehído (Laboratorios Laitz SA de CV), (método descrito por Sambrook, J., *et al.* 1989). En una cámara BRL Modelo H5 (Bethesda Research Laboratories, Life Technologies, Inc.). A 60 volts (Bio-Rad, modelo 250/2.5). Se utilizó buffer de corrida (37% formaldehído) y buffer 1x HE (Stock 10x 0.5M (Ácido N- (2-hidroxietil) piperazina-N'- (2-etanosulfónico, (HEPES) USB Co.), 0.02M Ácido etilen-di-amino-tetracético (EDTA), Sigma Chemical Co.)

Terminada la electroforesis se lavó en el gel por media hora en una solución de SSC 20x (Stock SSC 20x, 0.15M Cloruro de Sodio y 0.015M Citrato de Sodio, ambos de J.T. Baker) manteniendo una agitación constante.

TRANSFERENCIA DEL ARN A UNA MEMBRANA

Se transfirió el ARN por capilaridad a membranas de nitrocelulosa reforzadas por nylon (Hybond C-extra, Amersham) de acuerdo a la técnica descrita por Thomas, P. (1980). Con este propósito se utilizó una solución de SSC 10x (Stock SSC 20x, 0.15M Cloruro de Sodio y 0.015 M Citrato de Sodio, ambos de J.T. Baker).

Terminada la transferencia, la membrana de nitrocelulosa reforzada con nylon, se horneó a 80 °C por 2 horas con el fin de fijar en ella las muestras de ARN (Thomas, P. 1980).

CUANTIFICACIÓN DE ADN Y ARN

Para cuantificar la concentración de ADN y ARN, se hicieron diluciones de cada una de las muestras de 1:100 en un volumen final de 1 ml. Cada muestra fue leída en el espectrofotómetro (Beckman DU-50) con una lámpara de luz ultravioleta en 2 longitudes de onda: 260 y 280 nanómetros (nm).

A partir de las siguientes fórmulas, se cuantificó la concentración de ARN y ADN.

Para ADN: Una unidad de Densidad Óptica a una longitud de onda de 260 nm., es igual a 50 mg/ml.

Para ARN: Una unidad de Densidad Óptica a una longitud de onda de 260 nm., es igual a 40 mg/ml.

La fórmula general para cuantificar ADN o ARN es la siguiente:

Las concentraciones de ARN o ADN son iguales a la lectura de la muestra leída a una longitud de onda de 260 nm por el factor de dilución y por la unidad de densidad óptica correspondiente a lo que se quiera cuantificar, ya sea ADN o ARN (Sambrook, J., *et al.* 1989).

VALORACIÓN DEL ESTADO DEL ADN Y ARN

Para conocer las condiciones en las que se encontraban las muestras de ARN y ADN previamente purificadas, se tomó de cada una el equivalente en volumen a 1 µg; se les agregó buffer de muestra (Azul de bromofenol 0.025% , Kodak, Xilen-cianol 0.025%, Sigma

y Ficoll tipo 400 15%, Pharmacia) y se colocaron las muestras de ADN en un gel de agarosa 0.8%, mientras que las muestras de ARN se colocaron en un gel de agarosa 1.2% (USB Co.) con Bromuro de Etidio 0.01%, (Sigma, 1 gramo de Bromuro de Etidio en 100 ml de agua) y cada una de las muestras se colocó en un pozo. El gel se corrió en una cámara de electroforesis (OWL) que contenía buffer de corrida o buffer de electroforesis TBE 1x a 65 volts por una hora aproximadamente y posteriormente se observó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta con lo que se valoró la pureza o degradación de cada una de las muestras (Sambrook, J., *et al.* 1989).

MÉTODOS UTILIZADOS PARA OBTENER SONDAS

CRECIMIENTO Y COSECHA DE BACTERIAS

En un tubo de ensaye con tapa metálica se colocan 2 ml de medio esencial mínimo y se esterilizó utilizando una autoclave. Se incubó durante la noche a 37°C, para asegurares de que se encontrara estéril, se dejó enfriar y se le adicionó el antibiótico adecuado junto con una colonia de bacterias. Se incubó durante toda la noche a 37°C. El medio con la bacterias crecidas se colocó en tubos de centrifuga y se centrifugó a 12,000g por 30 segundos a 4°C. Se elimino el medio por aspiración y se dejo que el botón de baterías se seicara.

PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO

Se purificó el ADN del plásmido siguiendo la técnica descrita por Sambrook, J., *et al.* (1989) por ebullición en buffer de lisis. Este método es una modificación del descrito por Holmes D.S. y Quigley, M. (1981) y consiste en la resuspensión del botón de bacterias (obtenido en el método de crecimiento y cosecha de bacterias explicado anteriormente) en 350 µl de STET (0.1M NaCl (J.T. Baker), 10mM Tris-HCL pH=8 (Sigma Chemical Company,

Inc.), 1mM EDTA pH=8 (Sigma Chemical Company, Inc.) y 5% TritónX-100, Sigma Chemical Company, Inc). Se agregaron 25 µl de Solución de lisozima fresca (10 mg/ml en 10 mM Tris-HCL pH=8; Sigma Chemical Company, Inc) se mezclaron en el vortex por 3 segundos.

Posteriormente el tubo se colocó en agua hirviendo por 40 segundos, se centrifugó el lisado de bacterias a 12,000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Se removió el botón de bacterias con una pipeta y se agregaron 40 µl de 2.5M acetato de sodio pH=5.2 y 420 µl isopropanol al sobrenadante, se mezcló por vortex y se almacenó 5 minutos a temperatura ambiente. Para la recuperación de ácidos nucleicos se centrifugó a 12,000g por 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante por aspiración, para asegurarnos de que el botón se secase perfectamente se colocó el tubo en posición invertida sobre una toalla de papel secante de manera que el fluido pudiera escurrir. Se eliminan las gotas que quedaron en el tubo y se adicionó 1 ml de etanol al 70%. Se centrifugó a 12,000g por 2 minutos a 4°C, se aspiró el sobrenadante, y el etanol remanente se secó por evaporación en un tiempo aproximado de 2.5 minutos. Finalmente los ácidos nucleicos se disolvieron en 50µl de TE pH=8 y se almacenaron a -20°C.

PURIFICACIÓN DE LA SONDA

Se purifico el ADN de los plásmidos que contenían los insertos deseados. Se digirió el ADN con las enzimas de restricción seleccionadas y se recuperó la banda del inserto por electroforesis. Posteriormente fue purificada usando la técnica recomendada por el fabricante del juego de reactivos Genclean II BIO 101, que consiste en la adherencia del ADN a una matriz de cristales de sílice, los cuales posteriormente se lavan para recuperar el ADN.

CARACTERÍSTICAS DE LAS SONDAS UTILIZADAS

Se utilizaron cADNs que reconocían a los genes Clase I del Complejo Principal de Histocompatibilidad murino con los Haplotipos H-2 K^d, H-2D^d y H-2L^d.

El cADN de H-2 K^d, corresponde a un inserto de 966.7 pares de bases (pb) que está limitado por la secuencia que reconoce la endonucleasa de restricción Hind III, clonado en pBR322. Esta sonda contiene casi toda la región codificadora del gen, la cual fue enviada por el Dr. Philippe Kourilsky (Lalanne, J., 1983).

El cADN de H-2 L^d, es un inserto de 441.2 pb limitado por la secuencia que es reconocida por Bam HI y Bgl II, clonado en pBR322 y que contiene los exones: II (corresponde a 1/3 de N), III (corresponde a C₁) y IV (corresponde a C₂). Donado por el Dr. D.H. Margulies (Evans G.A., *et al.* 1982).

El cADN de H-2 D^d, es un inserto de 320 pb limitado por la secuencia que reconoce la endonucleasa de restricción con Hind III, que contiene los exones IV (corresponde a la mitad de C₂), V (codifica la región transmembranal), VI (codifica I₁) y VIII (codifica I₃), enviado por el Dr. D.H. Margulies (McCluskey, J., *et al.* 1986).

El fragmento de ADN genómico de β_2 -m, es un inserto de aproximadamente 1 kilopares de bases (kpb) limitado por la secuencia de reconocimiento de EcoRI, que contiene una parte del exon 2 (exon que codifica la mayor parte de esta proteína) (Parnes, J.R., *et al.* 1986).

El fragmento de Histona 4, inserto de 690 pb, limitado por la secuencia de reconocimiento de la endonucleasa de restricción de EcoRI, fue clonado en PBR322 (Seiler-Tuyns, A., *et al.* 1981).

MARCAJE RADIOACTIVO POR UN CEBADOR INCORPORADO AL AZAR (RANDOM PRIMER)

El ADN de doble cadena se marcó por la incorporación de (^{32}P) a-dATP (Amersham International, U.K.), (Maniatis, T., Tritsh, F. y Sambrook, J.K., 1982.) por el método de "Random Primer". El método consiste en la desnaturalización del ADN y la unión de un hexanucleótido que sirvió como cebador seguido de la adición de nucleótidos fríos, excepto dATP. Se agregó aproximadamente 50 μCi de fósforo (^{32}P) y una enzima que catalizó la polimerización del ADN (Klenow de 3 a 8 unidades). El tiempo de la reacción fue de 24 hrs. y fue interrumpida al adicionar 2 ml de EDTA 0.5 M pH=8 y 75 ml de Tris-EDTA (10mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8).

PURIFICACIÓN DEL ADN RADIOACTIVO POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

En estos experimentos se usó el método descrito por Ausubel, F.M., *et al.* (1987).

Para la separación de ADN marcado radioactivamente de precursores de dNTP no incorporados, se utilizó una cromatografía en columna. Esta técnica elimina los dNTP no incorporados por la diferencia de peso molecular. La columna se preparó en una jeringa de 1 ml y se puso un poco de fibra de vidrio; luego se llenó con sephadex 50-300 G (Sigma, 1g por 10 ml. de TE esterilizada en la autoclave por 20 minutos) y se centrifugó 1 minuto a 1,200 rpm. en una centrífuga Beckman TJ-6. Ya compactada la columna, se colocó la sonda de cADN marcada con fósforo radioactivo y se centrifugó por 5 minutos a 1,200 rpm. Posteriormente con el contador de radioactividad, se tomó el valor en cuentas por minuto (cpm) de la columna y del microtubo; la radioactividad se monitoreó utilizando un contador de radioactividad (VICTORIA). Con estos valores se calculó el porcentaje de incorporación

de fósforo en la sonda de cADN. El microtubo que contenía la sonda se colocó en agua hirviendo por 10 minutos y después se colocó 5 minutos en hielo.

HIBRIDACIÓN EN FASE SÓLIDA: “NORTHERN Y SOUTHERN BLOT”

PREHIBRIDACIÓN SOBRE MEMBRANAS

Se prehibridó la membrana de nitrocelulosa reforzada con nylon, durante 5 Hrs a 42 °C. Solución de prehibridación: 50% Formamida (Sigma Chemical Co.), SSC 6x (Stock SSC 20x, 0.15 M Cloruro de Sodio y 0.015 M Citrato de Sodio, ambos de J.T. Baker), Denhart 5x (Stock 50 x Solución Denhart: 1% Ficoll tipo 400 (Pharmacia Fine Chemicals), 1% Polivinilpirrolidona (PVP), Sigma Chemical Co.), 1% Albúmina de Suero Bovino Fracción V (BSA), Sigma Chemical Co.), 0.5% Dodecil sulfato de sodio (SDS, Merk) y 100 mg/ml ADN de Salmón (USB Co.). La técnica anterior fue descrita por Sambrook, J., *et al.* (1989).

HIBRIDACIÓN

Para la hibridación del filtro se eliminó un 35% del volumen de la solución de prehibridación y se agregó la sonda marcada. En seguida, se incubó a 42°C durante una noche.

Para evitar manchas radioactivas inespecíficas en la membrana, se eliminó la solución de hibridación. Hubo tres lavados: el primero de 20 minutos a temperatura ambiente con SSC 2x (Stock SSC 20x: 0.15 M Cloruro de Sodio y 0.015 M Citrato de Sodio, ambos de J.T. Baker), SDS 0.1% (Dodecil sulfato de sodio). Las condiciones para el segundo y tercer lavados: SSC 0.1%, SDS 0.1% a 50°C por 20 min. en agitación constante. Después de esto se monitoreó la radioactividad de la membrana utilizando un contador de radioactividad

(VICTORIA). Si la marca radiactiva era mayor a 50 cpm, se volvía a lavar el filtro utilizando las condiciones del segundo lavado. Esto se hizo cuantas veces fuera necesario con el fin de eliminar todas las manchas radioactivas inespecíficas.

AUTORADIOGRAFÍA

La membrana se cubrió con plástico transparente delgado y se expuso a una placa de rayos X (Kodak) de alta sensibilidad por 4 días a -70 °C. Posteriormente se reveló (Revelador RP x-Omat, Kodak) por 2 minutos y medio en agitación; se enjuagó con agua y se fijó por dos minutos y medio en agitación (fijador y reforzador RP X-Omat, Kodak).

REHIBRIDACIÓN DE LA MEMBRANA CON UNA SONDA Y ELIMINACIÓN TOTAL DE LA MARCA RADIOACTIVA EN UNA MEMBRANA.

Metodología descrita por Sambrook, J., *et al.* (1989) y Thomas, P.(1980).

Para tener un control de expresión (integridad de la preparación de ARN) se hibridó la membrana con la sonda para histona 4, después de eliminar la sonda en la primera fase del experimento lavando la membrana tres veces con 165 ml. de SDS 0.1% a 100 °C por un tiempo de diez minutos en cada lavado. Además se mantuvieron en agitación y con temperatura constante.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS

CULTIVO CELULAR

PROPAGACIÓN *in vivo* DE LR.4

La línea celular tumoral LR.4 se inyectó intra-peritonealmente provocando un aumento de volumen abdominal y peso en el ratón.

TRATAMIENTO DE LR.4 CON 5-Azacitidina.

Se trataron células de la línea LR.4 con 10 mM de 5-Azacitidina durante 3 días y se mantuvieron en cultivo, un lote de células por 7 días y otro lote por 30 días después del tratamiento. Durante el tratamiento se observó que las células mostraban variaciones morfológicas al compararlas con el control (células cultivadas *in vitro* y no tratadas con 5-Aza). Las variaciones en las células tratadas fueron: aumentó el tamaño y morfología. Se observaron células alargadas y ovaladas, cuya membrana citoplasmática presentó ondulaciones en tanto que el citoplasma era vacuolado.

Se observó que el porcentaje de viabilidad de las células tratadas con el análogo de la citidina fue de 80% mientras que en las células control fue de 92.5%. Había 3 veces mayor número de células en el lote control que en el de las células tratadas.

Los períodos de recuperación fueron de 7 y de 30 días, tiempo que se consideró suficiente para observar, tanto las variaciones morfológicas de las células, como las variaciones a nivel de la metilación del ADN y la expresión del ARN mensajero (ARNm) de los genes clase I del CPH.

ANÁLISIS DE ADN POR SOUTHERN BLOT

PATRÓN DE RESTRICCIÓN DE LOS GENES K,L Y D CLASE I DEL CPH OBTENIDO DE LA DIGESTIÓN CON Kpn I y Eco RI.

Uno de los objetivos de este trabajo fue conocer el patrón de restricción del ADN extraído del bazo de DBA/2 y de la línea celular LR.4.

Al digerir el ADN de estas muestras con la endonucleasa de restricción KpnI e hibridar con las sonda H-2D^d y H-2K^d (Figura 14) se observó que el patrón de bandas obtenido con ambas sondas era idéntico, lo cual corroboró la homología que existe entre las regiones conservadas de los genes del CPH clase I. Sin embargo, estas sondas solo reconocieron a partir del tercer exon y como nos interesaba conocer el extremo 5', se utilizó una sonda H-2L^d. Al digerir ADN con la endonucleasa EcoRI e hibridar con las tres sondas (Figura 15) se observó que el patrón obtenido con las sondas H-2D^d y H-2K^d fue idéntico, mientras que la sonda H-2L^d mostró mayor número de bandas y, por lo tanto, mayor información del gen. La sonda H-2L^d nos da un mayor número de bandas y además reconoce secuencias de la región 5' de los genes clase I del CPH, por esta razón se utilizó para el resto de los estudios de metilación.

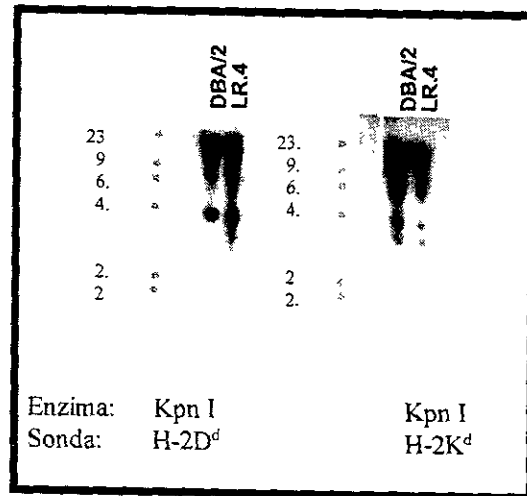


Figura 14. ANÁLISIS POR SOUTHERN BLOT DE LAS MOLÉCULAS CLASE I DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE LA LÍNEA CELULAR LR.4 Y DEL BAZO DEL RATÓN DBA/2.

Se muestran 10µd de ADN purificados a partir: bazo del ratón DBA/2 y de la línea celular LR.4 cultivada *in vitro*, digeridos con la endonucleasa de restricción KpnI e hibridados con las sondas: H-2D^d y H-2K^d. Del lado izquierdo se observan los fragmentos (23 Kb, 9 Kb, 6 Kb, 4Kb, 2.3 b y 2Kb) obtenidos al digerir ADN del fago λ con la endonucleasa de restricción Hind III.

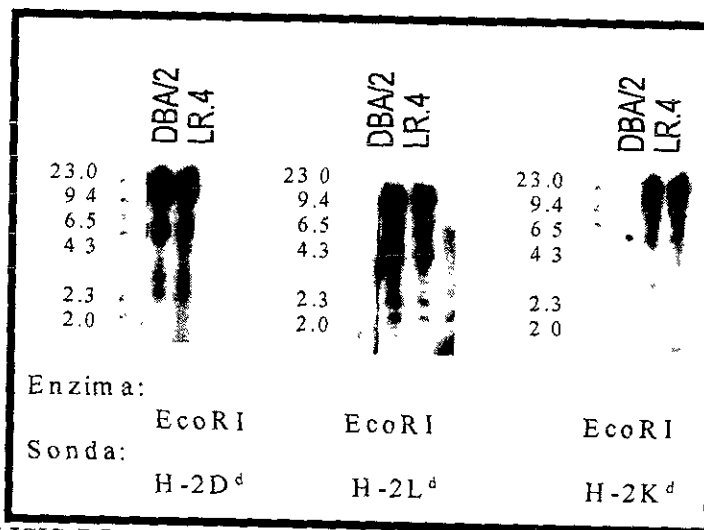


Figura 15. ANÁLISIS POR SOUTHERN BLOT DE LAS MOLÉCULAS CLASE I DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE LA LÍNEA CELULAR LR.4 Y DEL BAZO DE DBA/2.

El ADN genómico, purificado a partir del bazo del ratón DBA/2 y de la línea celular LR.4 *in vitro*, fué digerido con la endonucleasa de restricción EcoRI e hibridado con las siguientes sondas: H-2D^d, H-2L^d y H-2K^d. Del lado izquierdo se muestran los fragmentos (23 Kb, 9 Kb, 6 Kb, 4Kb, 2.3Kb y 2Kb) obtenidos al digerir ADN del fago λ con la endonucleasa de restricción Hind III.

DIFERENCIAS EN LOS PATRONES DE RESTRICCIÓN DE LOS GENES CLASE I DEL CPH DE CEPAS MURINAS Y LÍNEAS CELULARES TUMORALES.

Para demostrar lo sensible que era el método para la detección de fragmentos que caracterizan a un haplotipo determinado, se digirió ADN del bazo de ratones H2^b (C57BL/6J) y H2^d (Balb/c y DBA/2) y de la línea celular LR.4. Se observó que al hibridar con la sonda H-2L^d existían diferencias en los patrones de restricción. La línea celular y las cepas murinas H2^d mostraron el mismo patrón, en tanto que en la cepa murina C57BL/6J los fragmentos eran de diferente tamaño. Estas diferencias en el patrón de restricción nos permitieron caracterizar a estos dos haplotipos (Figura. 16).

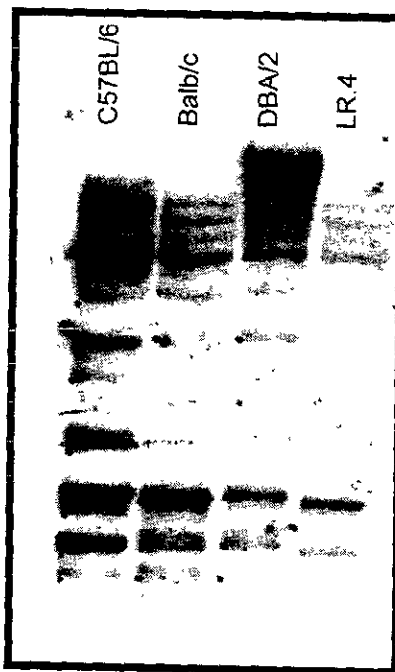


Figura 16. ANÁLISIS POR SOUTHERN BLOT DE LAS MOLÉCULAS DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD CLASE I DE LA LÍNEA CELULAR LR.4, Y DEL BAZO DE LAS SIGUIENTES CEPAS MURINAS: C57BL/6J, Balb/c Y DBA/2.

ADN genómico purificado a partir del bazo de los ratones: C57BL/6J, Balb/c y DBA/2, y de la línea celular LR.4. Los ADN de estas muestras fueron digeridos con la endonucleasa de restricción BamHI e hibridados con la sonda H-2L^d.

El determinar que la sonda podía reconocer cambios en el patrón de restricción fue muy importante para los estudios de metilación donde las variaciones del patrón de restricción podrían ser sutiles o muy marcadas.

ANÁLISIS DE METILACIÓN DE LA CEPA MURINA DBA/2 Y DE LA LÍNEA CELULAR LR.4 Y CAMBIOS INDUCIDOS POR EFECTO DE LA 5-Azacítidina EN LA LÍNEA CELULAR TUMORAL LR.4

Para estudiar los niveles de metilación de la línea celular LR.4 se digirió ADN genómico de la línea celular y de bazo de DBA/2 (muestra control) con las endonucleasas de restricción MspI y HapII y se hibridó con la sonda H-2L^d. En la figura 17 del lado izquierdo se muestran la digestión de ADN genómico con la enzima MspI, donde el patrón de restricción de todas las muestras es idéntico, mientras que en el lado derecho de la autoradiografía donde el ADN se digirió con la endonucleasa de restricción HapII, se muestra el patrón basal de metilación de los genes clase I en el carril que contiene ADN de bazo de DBA/2, hipermetilación de la línea celular LR.4 y la hipometilación de la línea celular LR.4 a los 7 y 30 días después del tratamiento con 5-Azacítidina. Los niveles de hipermetilación de la línea celular LR.4 se determinan observando fragmentos de alto peso molecular al digerir el ADN con la enzima HapII y al comparar el patrón de restricción con el obtenido al digerir el mismo ADN con al enzima MspI.

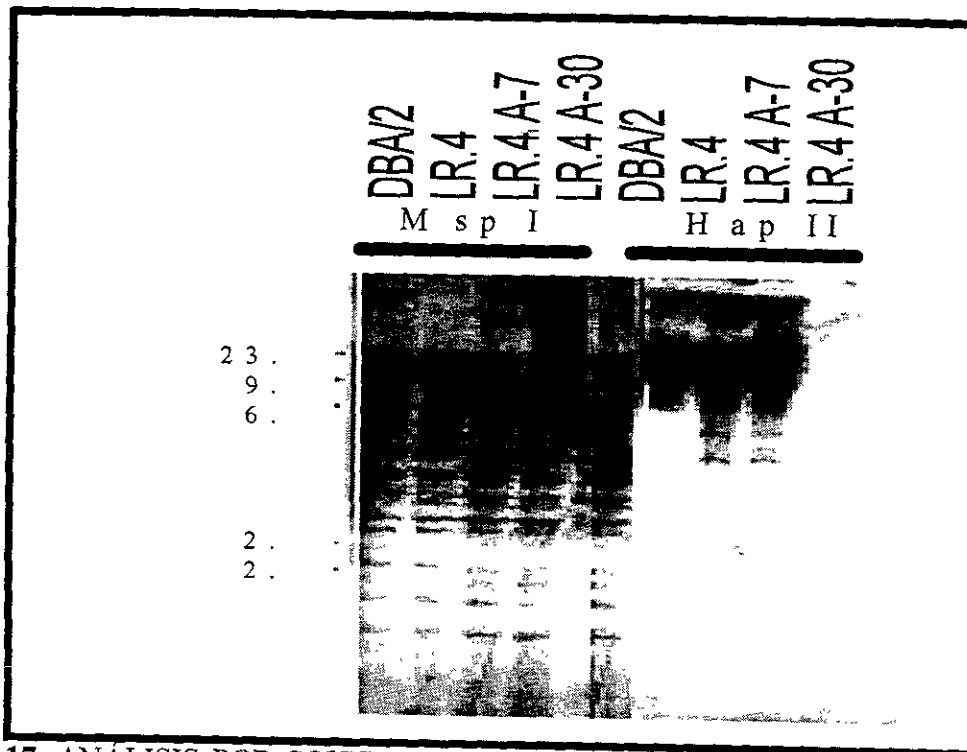


Figura 17. ANÁLISIS POR SOUTHERN BLOT DE LOS NIVELES DE METILACIÓN DE LAS MOLÉCULAS CLASE I DEL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE LA LÍNEA CELULAR LR.4 TRATADA A LOS 7 Y 30 DÍAS CON 5-AZA, SIN TRATAMIENTO Y EL BAZO DEL RATÓN DBA/2. Se muestra DNA genómico purificado de la cepa murina DBA/2 y de la línea celular LR.4 *in vitro*, LR.4 siete días después con un tratamiento de 5-Azacitidina (LR.4 A-7) y LR.4 treinta días después de un tratamiento con 5-Azacitidina (LR.4 A-30). Estos ADNes fueron digeridos con las endonucleasas de restricción HapII(lado izquierdo)y MspI (lado derecho)(que cortan la secuencia CCGG, donde la segunda no corta si la citosina interna está metilado) e hibridados con la sonda H-2L^d. Los valores a la izquierda indican los fragmentos del ADN del fago I digeridos con la endonucleasa Hind III (23Kb, 9Kb, 6Kb, 4Kb, 2.3Kb y 2Kb).

La comparación de ambos patrones de restricción indicó que el ADN no estaba siendo digerido por la endonucleasa HapII debido a la presencia de una citosina interna metilada en la secuencia de reconocimiento '-CCGG-'. Al comparar el patrón de restricción del resto de las muestras utilizando la misma endonucleasa, se observó que en las células LR.4 tratadas con el agente hipometilante existían fragmentos de menor tamaño (aproximadamente 2 kbp), porque la enzima estaba digiriendo las siguientes secuencias '-CCGG-', en las cuales la citosina interna había sido reemplazada por 5-Azacitidina o por una citosina no metilada. Esto

nos dio un patrón de restricción con niveles de hipometilación, en tanto que, al comparar el patrón de restricción de las células tratadas con 5-Azacitidina con el del bazo del ratón DBA/2 cuando se había digerido con HapII, se observó que era idéntico, por lo que se determinó que el nivel basal de metilación del bazo del ratón DBA/2 podía ser el adecuado para lograr la expresión de moléculas clase I en estas células.

También fue importante notar que, al tratar células con 5-Azacitidina, no se obstruyó la secuencia de reconocimiento de la endonucleasa al ADN. Resultó importante que con un sólo tratamiento de 10 mM de 5-Azacitidina, el patrón de hipometilación de la línea celular LR.4 se mantuvo hasta 30 días después del tratamiento.

PATRÓN DE RESTRICCIÓN DEL GEN DE B₂m:

Para conocer el patrón de restricción del gene de B₂m se digirió el ADN genómico de las cepas murinas (C57BL/6J, Balb/c y DBA/2) y de la línea celular LR.4 *in vitro* con la endonucleasa de restricción Bam HI. En la figura 18 se observó que el fragmento de aproximadamente 10 kbp sólo estaba presente en los carriles que contenían las muestras de las cepas murinas y no en la línea celular tumoral.

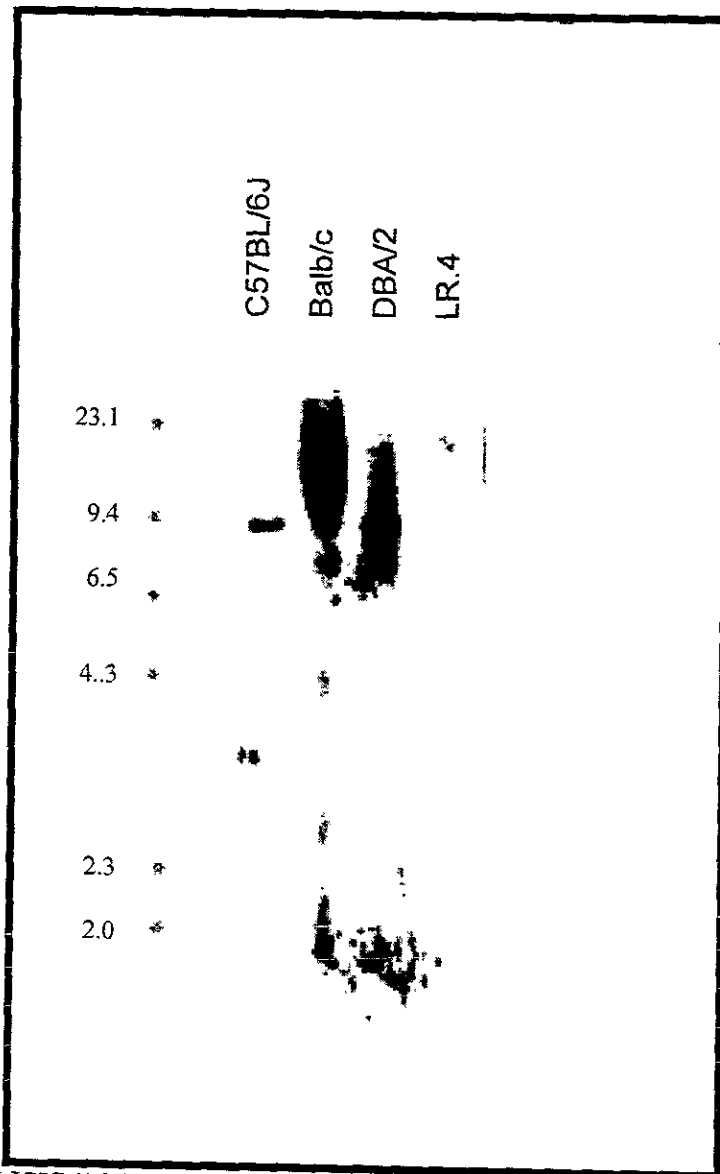


Figura 18. ANÁLISIS POR SOUTHERN BLOT DEL PATRÓN DE RESTRICCIÓN DEL GENE DE B₂m DE LAS CEPAS MURINAS (C57BL/6J, Balb/c Y DBA/2) Y DE LA LÍNEA TUMORAL LR.4

Se muestra ADN genómico purificado a partir de la línea celular LR.4 y del bazo de las cepas murinas C57BL/6J, Balb/c y DBA/2 digeridos con la endonucleasa de restricción BamHI e hibridados con la sonda B₂m. En el lado izquierdo se muestran los fragmentos al digerir ADN del fago I con la endonucleasa de restricción Hind III.

Posteriormente este filtro se lavó e hibridó con la sonda que reconoce una región del gen de Histona 4 (gen constitutivo), y se observa que en la figura 19 que los carriles que

contienen ADN genómico de las cepas murinas así como el carril que contiene ADN genómico de la línea celular LR.4 presentan un fragmento de 10 kpb. Con este grupo de resultados se determinó que la secuencia utilizada para el reconocimiento del gene de B₂m en línea celular LR.4 se encuentra deletada, ya que fue posible detectar la secuencia de B₂m en el resto de las muestras.

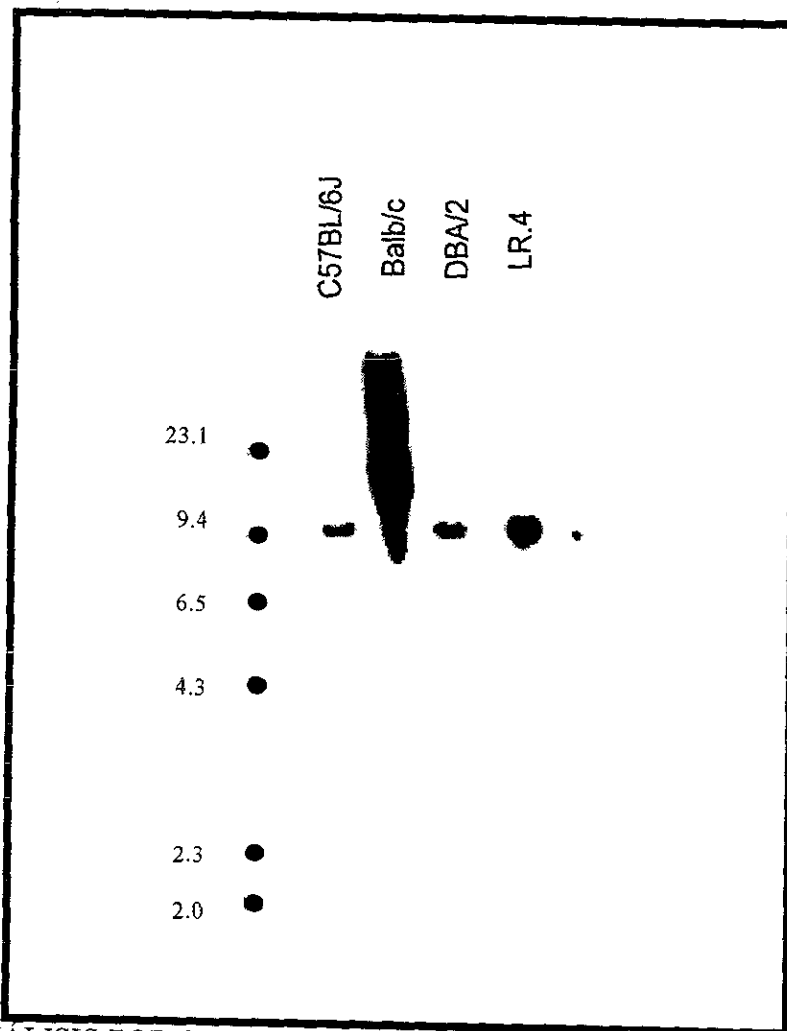


Figura 19. ANALISIS POR SOUTHERN BLOT DEL PATRÓN DE RESTRICCIÓN DEL GENE DE HISTONA 4 DE LAS CEPAS MURINAS (C57BL/6J, Balb/C Y DBA/2) Y DE LA LÍNEA TUMORAL LR.4

Se muestra ADN genómico purificado a partir de la línea celular LR.4 y del bazo de las cepas murinas C57BL/6J, Balb/c y DBA/2 digeridos con la endonucleasa de restricción BamHI e hibridados con la sonda Histona 4. En el lado izquierdo se muestran los fragmentos obtenidos al digerir ADN del fago I con la endonucleasa de restricción Hind III.

Es importante mencionar que LR.4 muestra una deleción que incluye a la región de alta frecuencia de mutaciones y que no se identifica el patrón de restricción que corresponde al gen normal. Lo anterior sugiere que el alelo normal se perdió o algo menos probable, que los cromosomas tengan una alteración idéntica.

ANÁLISIS DE ARN POR NORTHERN BLOT

EXPRESIÓN DE GENES DEL CPH CLASE I.

Al analizar el transcrito para genes clase I del CPH, se observó que al tratar las células con 5-Azacidina se indujo la expresión del ARNm, en tanto que en el control, células LR.4 sin tratamiento, el transcrito observado fue casi nulo (Figura 20).

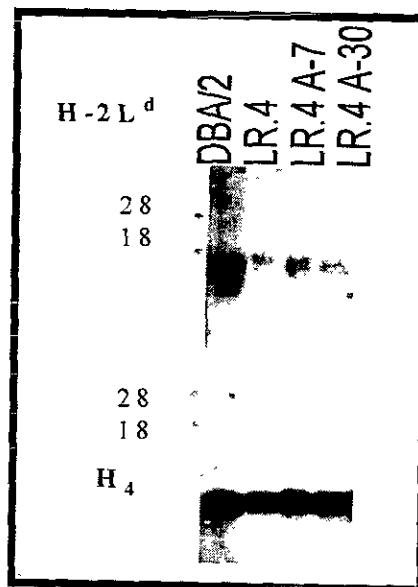


Figura 20. ANÁLISIS POR NORHERN BLOT DE LAS MOLECULAS CLASE I (Panel superior) y DE HISTONA 4 (Panel inferior) DEL BAZO DEL RATÓN DBA/2, Y DE LA LÍNEA CELULAR TUMORAL LR.4 EN TRES DISTINTAS CONDICIONES.

Se muestran 10µg de ARN extraídos del bazo de ratones DBA/2 y de la línea celular LR.4 en tres distintas condiciones experimentales fueron hibridados con la sonda H-2L^d. Las células LR.4 fueron: un control sin tratamiento y muestras correspondientes a cultivos tratados durante siete o treinta días con 5-Azacidina (LR.4 A-7 y LR.4 A-30 respectivamente). El panel inferior corresponde al control de expresión en cual se usó un plásmido para Histona 4 y las mismas muestras de ARNm.

EXPRESIÓN DEL GEN B₂-M.

Al analizar la expresión del gene de B₂m de la línea celular LR.4 no se observó el transcritos que codifica este gen, esto fue una consecuencia de la deleción detectadas en los experimentos hechos con ADN extraído de línea tumoral. Por el contrario, el ARNm obtenido del bazo de ratones DBA/2 dio una señal positiva, tal y como era lo esperado (Figura. 21).

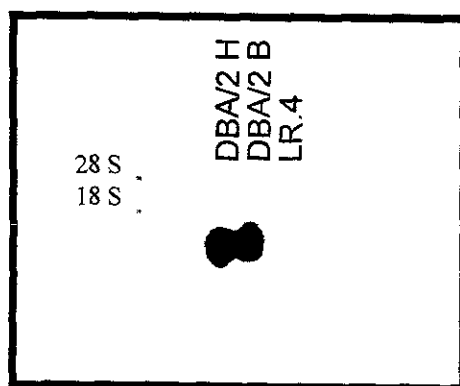


Figura 21. ANÁLISIS POR NORHERN BLOT DEL GENE DE B₂m DEL HÍGADO Y BAZO DEL RATÓN DBA/2, Y DE LA LÍNEA CELULAR TUMORAL LR.4.

Se muestran 10µg de ARN extraídos del hígado y bazo de ratones DBA/2 y de la línea celular LR.4 y fueron hibridados con la sonda B₂m. LR.4, células tumorales; DBA/2 H, hígado de un ratón DBA/2 y DBA/2 B, Bazo extraído de un ratón DBA/2.

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN

En estudios anteriores se demostró que la línea celular LR.4 (Nava, G., *et al.* 1992) no expresaba moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad; posiblemente porque estos genes pudieran estar hipermetilados. Esto se demostró a lo largo de este proyecto, y se pensó que si se alteraban los niveles de metilación en los genes que codifican las glicoproteínas clase I, estas células podrían expresar moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad, siguiendo esta línea de investigación, los resultados presentados en el capítulo anterior describen los patrones de metilación y los niveles de metilación de los genes del complejo principal de histocompatibilidad murinos de una línea celular tumoral LR.4.

Un examen de estos resultados nos permitió dar las conclusiones, posteriormente descritas, correspondientes a la determinación de la influencia del gen de B₂m y su relación con la expresión de los genes del CPH clase I, junto con la determinación de la importancia de los niveles de metilación en la expresión de estos genes.

CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR LR.4 CON 5-Azacidina

El tratamiento se inició cuando el cultivo de células se encontraban en la fase exponencial de crecimiento. El tiempo de tratamiento fue de 3 días, lo cual es considerado prolongado debido a que, en la bibliografía referente al tema (Li, L.H., *et al.* , 1970), se demostró que 24 horas de tratamiento de un cultivo celular es suficiente para observar

modificaciones fenotípicas en diferentes tipos celulares provenientes de estirpes murinas. Sin embargo, Pinto, A. y Zagonel, V. (1993) proponen tratamientos de mayor duración debido a que la 5-Azacitidina es un agente hipometilante específico de la fase de síntesis del cultivo celular, de manera que la incorporación del análogo solo se realiza durante esta fase y si los tratamientos fueran por períodos cortos, entonces las células blanco continuarían incorporando otras moléculas del análogo en los siguientes eventos de replicación.

Por esta razón se prefirió dar un tratamiento con mayor duración y así asegurarnos la incorporación de 5-Azacitidina al genoma de LR.4, la valoración de la incorporación fue realizada en base al único parámetro macroscópico con el que contábamos: las variaciones fenotípicas.

VARIACIONES FENOTÍPICAS DE LR.4

Las variaciones en LR.4 fueron observadas a los 3 días después de los tratamientos con el agente hipometilante 5-Azacitidina. Dichas variaciones fenotípicas incluyeron variaciones morfológicas así como variaciones a nivel molecular (variaciones a nivel de la metilación del ADN y de la expresión del ARN mensajero; ARNm). Dentro de las variaciones morfológicas las células tumorales exhibieron un aspecto característico en el citoplasma debido a la presencia de múltiples vacuolas, el cambio de forma, etc.

La habilidad de la 5-Azacitidina para inducir cambios fenotípicos, en la línea celular LR.4, concuerda con los estudios realizados con líneas celulares previamente tratadas con 5-Azacitidina: U-937 (leucemia monoblástica; Attadia, V. 1993), K562 (eritroleucemia humana; Attadia, V., *et al.* 1990; Gambari, R., *et al.* 1986), FAB-M2, FAMB-M4 y FAB-M5 (leucemia; Pinto, A., *et al.* 1984), HL60 (células promielocíticas humanas, Christman, J.K., *et al.* 1983), eritroleucemia de Friend (Creust, P. 1982) en fibroblastos (Sanger, R. y Kovac, P.

1982), y en otros tipos celulares descritos por Jones, P.A. y Taylor, S.M. (1980), en estos ejemplos no solo se observaron variaciones fenotípicas sino que también se modificaron los patrones de diferenciación celular. En el presente estudio solo nos fue posible observar las variaciones morfológicas debido a que la caracterización de la línea celular LR.4 (línea doble negativa: CD4-CD8-realizada por Verastegui, E. y colaboradores, 1997) se realizó antes de iniciar los tratamientos con 5-Azacitidina y no después de ellos.

VIABILIDAD CELULAR

Al comparar el porcentaje de viabilidad entre las células LR.4 control y las células LR.4 tratadas con 5-Azacitidina, se observó que existe mayor muerte celular en el grupo que recibió 5-Azacitidina. Esto se debe a que la 5-Azacitidina es un agente químico tóxico para las células. Sin embargo, el 80% de la población de células tratadas sobrevivieron y sólo el 12.5% de las células murieron en comparación con el control. La muerte celular se debió principalmente a la dosis utilizada de 5-Azacitidina, lo cual fue demostrado por Li, L.H. y colaboradores (1970), quienes observaron que al tratar la línea L1210 de leucemia linfocítica de una cepa murina DBA/2 con 0.019 y 0.15 mg/ml de 5-Azacitidina (5×10^5 células/ml durante 3 días a 37°C), existía una muerte del 50% y 90% respectivamente, a consecuencia de la concentración utilizada del agente hipometilante. Los datos de muerte celular de LR.4 concuerdan con los valores anteriores debido a que la dosis utilizada en el tratamiento de LR.4 fue de 0.2442 mg/ml (1×10^5 células/ml) durante 3 días a 37°C .

Al tercer y último día del tratamiento existieron tres veces más células en el lote control, que en el lote con células tratadas, lo cual indica que la incorporación del agente hipometilante tiene un papel importante al incorporarse en la fase S tardía y bloquear la progresión del ciclo celular porque inhibe la entrada a la fase M. El aumento en el número de

células en el control se debe al desfaseamiento de la división celular entre estas células y las tratadas.

GENES CLASE I DEL CPH

Se digirió ADN genómico de LR.4 (H-2L^d) y de diferentes cepas murinas, dos de las cuales presentaron haplotipo d (DBA/2 y Balb/c) y la otra con haplotipo b (B6) y se observó que la sonda H-2L^d es capaz de reconocer tanto haplotipos b y d. Posiblemente esto se debió a que existe entre los genes clase I una alta homología; sin embargo, los tamaños de los fragmentos que se observaron en la Figura 16 no eran idénticos, por lo que hubo 2 bandas que solo se reconocieron en el ADN del ratón B6. Estas diferencias indicaron que existe un patrón de restricción diferente en los genes clase I del ratón B6 y los ratones DBA/2, Balb/c y LR.4.

Se encontró que la sonda H-2L^d es capaz de reconocer secuencias con alta homología entre los haplotipos d y b. Esto se debió a que esta sonda reconoció en estos genes secuencias que corresponden a los exones que codifican los dominios extracelulares α_1 y α_2 , que por ser los encargados de unir el péptido al CPH caracterizados por su alto polimorfismo. Es decir, son genes en los que la secuencia de nucleótidos varía con una frecuencia relativamente alta dentro de una población de individuos normales y el 1% de los individuos puede expresar un gen que se diferencia de un gen homólogo que permanece en el resto de los miembros de una población. Esto nos indicó que la sonda que estábamos utilizando tenía la capacidad de reconocer secuencias homólogas en un grupo de genes con alto polimorfismo.

VARIACIONES GENOTÍPICAS.

La 5-Azacitidina tuvo un efecto genotípico en las células tumorales debido a que modificó el patrón de restricción de LR.4. La forma en que lo hizo fue disminuyendo los niveles de metilación en esta línea celular.

Existen evidencias de que las líneas celulares al envejecer tienden a hipometilarse (Wilson y Jones, 1983) a excepción de las líneas celulares inmortales. Las modificaciones en los patrones de metilación observados en la figura 17 entre la línea celular LR.4 y las células tratadas con 5-Azacitidina no se debieron a un efecto del envejecimiento celular, sino a la incorporación del agente hipometilante al ADN. El efecto del envejecimiento se puede descartar debido a que las células de la línea LR.4 fueron mantenidas *in vitro* durante todo el experimento como control durante 38 días, tiempo idéntico al que se mantuvieron las células tratadas con 5-Azacitidina.

Wilson y Jones (1993) también han reportado que las células normales diploides no se replican indefinidamente *in vitro* al menos que sean alteradas por una transformación heredable para producir líneas celulares inmortales. El mecanismo para tal conversión espontánea de células senescentes a células inmortales es desconocido, pero alteraciones en la expresión de genes se involucran probablemente en este proceso y alteraciones en los patrones de metilación pueden causar cambios en la expresión de genes que puedan estar involucrados en el envejecimiento del cultivo. Es decir, en cultivos que han sido expandidos durante largos períodos, el porcentaje de 5-metilcitosina disminuye notablemente conforme el período del cultivo aumenta. En otros reportes se propone que las líneas celulares disminuyen su metabolismo quedando solo funcionales los genes indispensables para su sobrevivencia (el que funcionen todos los genes sería un gasto para la célula). Ninguno de estos dos factores afecta a LR.4 debido a que los genes hipermetilados de clase I se mantienen con igual nivel de metilación, tanto en las células *in vivo* en la cavidad peritoneal de Balb/c, como en

comparación con las células que son mantenidas *in vitro*. La hipometilación en esta línea celular se observó a partir del tratamiento con 5-Azacitidina.

METILACIÓN DE LOS GENES DEL CPH CLASE I EN LR.4

Los genes de mantenimiento (Bird, A.P., 1986) y pocos genes tejido específicos (Kolsto, A.B., *et al.* 1986; Loyd, J., *et al.* 1987; Bird, A.P., 1987) contienen islas CpG en el extremo 5'. La característica general de esta isla es el estado no metilado en el que se encuentra la citosina.

Hasta ahora se le ha dado gran importancia a la correlación que existe entre secuencias CpG metiladas e inactivación de los genes, así como la correlación contraria, en la cual la citosina incluida en la secuencia CpG se encuentra desmetilada, lo que se relaciona con la expresión del gene estudiado.

Al analizar los patrones de metilación de los genes del CPH clase I en la línea celular LR.4 se observó que la presencia de secuencias CpG en las cuales la C se encontraba metilada, es decir como 5-metilcitosina, correlacionan perfectamente bien con la inactividad de estos genes. Es decir, los patrones de metilación de la línea celular tumoral LR.4 nos indican que, debido a la falta de expresión de las moléculas del CPH clase I, esta línea es capaz de crecer, desarrollarse y propagarse en diferentes cepas murinas, de manera que es capaz de cruzar barreras halogénicas (Nava, G., *et al.* 1992). Esta inactividad genética se debe a la localización de islas o secuencias CpG localizadas en la región 5' del gene, que se caracterizan por la presentación de una 5-metilcitosina, y de esta manera el gene muestra un patrón de hipermetilación como se observa en la figura 17, en cambio, en el bazo del ratón DBA/2, tejido en el cual la mayor parte de la población celular son linfocitos, se observa un patrón de hipometilación, debido a que la citosina que forma las islas CpG no se encuentra

metilada. De esta manera las células del bazo del ratón DBA/2 son capaces de expresar las moléculas del CPH clase I. En base a esto podemos decir que los patrones de metilación observados en la línea celular LR.4 así como el del bazo del ratón DBA/2 concuerda con la siguiente regla general: que los genes que se encuentran completamente desmetilados están altamente expresados, y por otro lado, también existen genes parcialmente desmetilados que presentan bajos niveles de expresión. También puede darse el caso en el que exista una ausencia de esta en la correlación como en el caso de los genes ApoA-1/C-III/A-IV en donde la hipometilación de estos genes se presenta tanto en tejidos que los expresan como en los tejidos que no se expresan esta familia de genes (Shemer, R., *et al.* 1991). De esta manera se ha determinado la expresión genética depende del tejido estudiado, de la secuencia estudiada así como del gen estudiado.

EFFECTOS DE LA 5-AZACITIDINA

El análogo de la citidina provoca efectos irreversibles, mostrados hasta 30 días después de que el fármaco haya sido removido del medio de cultivo de LR.4. en base a esto se observó que después del tratamiento se detecta una hipometilación del ADN así como la modulación de la expresión de los genes del CPH clase I.

MANTENIMIENTO DE LOS NIVELES DE METILACIÓN DE LR.4 DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON 5-AZACITIDINA.

El mantenimiento de los patrones de hipometilación era de esperarse debido a que en reportes anteriores se menciona el establecimiento de una unión covalente (irreversible) entre la enzima ADN-metiltransferasa y la 5-Azacitidina (que en este caso actúa como un nucleósido) y de esta manera el patrón de hipometilación del LR.4 es el mismo a los 7 y a los

30 días después del tratamiento. Esto se debe a que se modifica el patrón de metilación de la línea celular LR.4 por la incorporación del análogo de la citidina, y de esta manera al replicarse se mantendrán las citosinas no metiladas por el resto de las divisiones celulares (Síntesis semiconservativa del ADN).

EXPRESIÓN DE LOS GENES DEL CPH CLASE I

Un tratamiento de 3 días con 5-Azacitidina en el cultivo de células tumorales LR.4 fue suficiente para observar un incremento en el transcrito de los genes clase I del CPH, es decir se indujo la expresión de estos genes, a los 7 días después del tratamiento y la presencia del transcrito se mantuvo hasta los 30 días después del tratamiento. De esta manera se corrobora la inducción de la expresión de los genes clase I del CPH en LR.4 debido a que al investigar la expresión de los genes que codifican para la tiroglobulina (Avvedimento, *et al.* 1989) y para la timidina kinasa (Clough, D.W., *et al.* 1983) y en los genes de γ -globina humana (Ley, T.J., *et al.* 1982) se ha observado un incremento en el transcrito de genes que previamente mostraban ser inactivos con el tratamiento de 5-Azacitidina.

Es importante notar, que el tratamiento con 5-Azacitidina modificó los patrones de metilación de las células LR.4 de manera que la desmetilación específica de la citosinas provocó un aumento en el nivel de expresión de los genes clase I del CPH (figura 20).

GEN DE B₂-M

Como se sabía que la presentación de péptidos endógenos por moléculas clase I en la superficie celular no solo dependía de los genes clase I, se analizó el gen que codifica la

cadena ligera de B₂-m encargada de formar un heterodímero con las moléculas clase I en el RE y unir péptido, para presentarlo en la superficie celular a linfocitos T.

Al analizar el gen de B₂-m , se demostró que LR.4 presentaba una delección en este gen, por la cual no se obtuvieron bandas en la autoradiografía, debido a que la secuencia que contenía la sonda era la misma que se encontraba deletada en LR.4. Para demostrar que no era un error técnico, se hibridó ese mismo filtro con H₄, y se observó que en todos los carriles estaba presente. Con esto se comprobó que la metilación no solo era importante para la presentación de péptidos en la superficie celular por moléculas clase I, sino que también lo era la delección que se presentó en los genes de Beta-2 microglobulina (Figuras 18 y 19).

EXPRESIÓN DE B₂-M

Al estudiar el transcrito para B₂-m se observó que no existía tal en la línea celular LR.4 (Figura 21) y aún con el tratamiento con 5-Azacitidina no se modificó la expresión de este gen (figura no mostrada).

CARACTERIZACIÓN DE LR.4

Se sabe que las células que se dividen en un ambiente artificial pueden disminuir su metabolismo, quedando sólo funcionales los genes indispensables para su sobrevivencia, ya que el mantenerse activos genes innecesarios, la célula tendría un gasto mayor del realmente necesario. Inicialmente se pensó que LR.4 podría haber hipometilado los genes clase I del CPH por algún mecanismo desconocido, debido a que es capaz de crecer en cepas murinas alogénicas (cepas murinas que presentan información genética diferente). Sin embargo, se

observó que al comparar LR.4 *in vitro* e *in vivo* el patrón de restricción de hipermetilación fue el mismo.

En cuanto a esto, se pensó que sería interesante ver el crecimiento de LR.4 tratada con 5-Azacitidina en cepas murinas alogénicas, pero cuando se demostró que LR.4 presentaba una deleción en el gen de B₂-m, se vio que no tenía ninguna importancia, debido a que, para la presentación de moléculas clase I en la superficie celular, era importante el ensamblaje de la cadena pesada de clase I con la ligera de B₂-m.

La hipermetilación de LR.4 llamó la atención debido a que se derivaba de una línea celular L5178Y (según publicación de Nava, G. y colaboradores, 1992), morfológicamente heterogénea, cuyos genes clase I se encontraban hipometilados. Esto fue interesante, ya que LR.4 fue seleccionada de estas células y, posiblemente L5178Y estaba formada por 2 poblaciones diferentes y la población que sobrevivió fue por la selección con 5-Bromo-2-deoxiuridina.

Existen diferencias en cuanto a L5178Y y LR.4, siendo la primera resistente a HAT (contiene Hipoxantina, Aminopterina y Timidina) y la segunda sensible. Esto implica que LR.4 tiene algún defecto en la enzima timidina cinasa (Tk-) y/o en la hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa (HGPRT), lo cual es vital debido a que las células animales normales sintetizan nucleótidos y timidilatos *de novo* a partir de fosforribosil pirofosfato y uridilato, respectivamente. Esto se realiza en varios pasos, uno de los cuales involucra la transferencia de un grupo metilo o formil del tetrahidrofolato activado. La aminopterina bloquea la reacción del tetrafolato, logrando inhibir la síntesis de purinas y timidilatos. Al ser estos componentes esenciales para el ADN, la aminopterina bloquea la síntesis de ADN por la vía *de novo*. Sin embargo, las células con este tratamiento pueden utilizar la vía salvaje en la cual la purina es sintetizada por la hipoxantina suplementada exogenamente y utilizando la enzima HGPRT. El timidilato es sintetizado a partir de timina utilizando la enzima Tk. Este defecto en LR.4 se

debe a que estas células no pueden utilizar la vía salvaje para sintetizar nucleótidos y timidilatos. Existe otro efecto sobre la enzima Tk cuando las células se someten a un tratamiento de 5-Bromo-2-deoxiuridina, en el que, al ser este fármaco metabolizada por la Tk, forma un producto sensible a la luz que es letal. Por esta razón L5178Y, muere en presencia de 0.1 mg/ml de 5-Bromo-2-deoxiuridina, mientras que LR.4 soporta dosis secuenciales hasta de 100 mg/ml.

También se pensó que tratar a LR.4 con 5-Bromo-2-deoxiuridina provocaría modificaciones en el patrón de hipermetilación, por lo que se analizó una muestra de LR.4 que había sido tratada hace cuatro años y mantenida en la cavidad peritoneal de ratones de Balb/c y muestras de LR.4 tratadas con un incremento de dosis y se demostró que el patrón de hipermetilación fue el mismo en todos los lotes de LR.4 (datos no incluidos). Por esto quedó descartado que el patrón hipermetilado de los genes clase I fuera debido a la selección de LR.4 con altas dosis de 5-bromo-2-deoxiuridina.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES

- 1.- La línea celular posee niveles de metilación altos en los genes del CPH clase I (genes hipermetilados), demostrado al comparar el patrón de restricción con Hap II de ADN genómico de la línea celular con ADN genómico del Bazo de un ratón de la cepa DBA/2.
- 2.- La metilación de los genes del CPH clase I es un factor importante involucrado en la ausencia de transcrito. Esto se demostró al tratarse las células con 5-Azacitidina, donde a los 7 días después del tratamiento se incrementó el transcrito de los genes clase I del CPH, y este se mantuvo hasta 30 días después del tratamiento.
- 3.- Un tratamiento con 5-Azacitidina es suficiente para modificar los niveles de metilación de los genes clase I del CPH en la línea celular LR.4, y la hipometilación se mantiene hasta 30 días después del tratamiento.
- 4.- Una secuencia de los genes de B_2 -m está deletada en la línea celular LR.4, razón por la cual los estos genes no se expresan.
- 5.- La existencia de mutaciones en el gen de B_2 -m puede afectar la expresión de los genes del CPH clase I en la superficie celular de LR.4, debido a que se requiere del ensamblaje de ambas proteínas en el retículo endoplásmico para la presentación de péptidos en la superficie celular, aunque existen líneas tumorales que logran la expresión del complejo péptido-moléculas clase I del CPH en la superficie celular aún cuando no existe una previa formación del complejo β_2 -m-CPH clase I. Por lo anterior, creemos que será interesante analizar y determinar posteriormente, si la causa de la ausencia de moléculas del CPH clase I en LR.4 se debe a mutaciones en los genes de B_2 -m y a la hipermetilación de los genes del CPH clase I, o a ambas.

CAPÍTULO IX
BIBLIOGRAFÍA

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

CAPÍTULO IX

BIBLIOGRAFÍA

- *Abbas, A.K., Lichtman, A.H. y Pober, J.S. (1994). CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY. W.B. Saunders Company, Segunda Edición, USA, 457 p.p
- *Adams, R.L.P. (1990) ADN METHYLATION. *Biochemical Journal* 256:309-320.
- *Attadia, V. (1993). EFFECTS OF 5-AZA-2'DEOXYCYTIDINE ON DIFFERENTIATION AND ONCOGENE EXPRESSION IN THE HUMAN MONOBLASTIC LEUKEMIA CELL LINE U-937. *Leukemia* 7 (suppl.monograph 1):9-16.
- *Attadia, V. Saglio, G. Fusco, A. Difiore, P.P. y Pinto, A.(1990) EFFECTS OF 5-AZA-2'-DEOXYCYTIDINE ON ERYTHROID DIFFERENTIATION AND GLOBIN SYNTHESIS OF THE HUMAN LEUKEMIC CELL LINE K562. In: R.L. Momparler and D. de Vos, eds. 5-aza-2'-deoxycytidine:preclinical and clinical studies. PHC, Haarlem, 1990, 89-103 p.p.
- *Avedimento, V.E., Obici, S., Sanchez, M., Gallo, A., Musti, A. y Gottesman, M.E. (1989). REACTIVATION OF THYROGLOBULIN GENE EXPRESSION IN TRANSFORMED THYROID CELLS BY 5-AZACITIDINE. *Cell* 58:1135-1142.
- *Bahram, S., Arnold, D., Bresnahan, M., Strominger, J.L. y Spies, T.(1991). TWO PUTATIVE SUBUNITS OF A PEPTIDE PUMP ENCODED IN THE HUMAN HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS II REGION. *Proceedings of the National Academy of Science. USA* 88(22):10094-10098.
- *Barber, L.D. y Parham, P. (1993).PEPTIDE BINDING TO MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX MOLECULES. *Annual Reviews in Biology* 9:163-206.
- *Barinaga, M. (1992).GETING SOME "BACKBONE ": HOW MHC BINDS PEPTIDES. *Science* 257:880-881.
- *Beck, S. Kelly, A., Radley, E., Khurshid, F., Alderton, R.P. y Trowsdale, J. (1992). ADN SEQUENCE ANALYSIS OF 66 kb OF THE HUMAN MHC CLASS II REGION ENCODING A CLUSTER OF GENES FOR ANTIGEN PROCESSING. *Journal of Molecular Biology* 228(2):433-441.

- *Benveniste, P., Chadwick, B.S. y Miller, R.G. (1990). DEVELOPMENT OF T CELLS IN VITRO FROM PRECURSOR IN MOUSE BONE MARROW. *Cell Immunology* 127(1):92
- *Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R. e Ingram, V.(1988). CLONING AND SEQUENCING OF A cDNA ENCODING DNA METHYLTRANSFERASE OF MOUSE CELLS. The Carboxyl-terminal Domain of the Mammalian Enzymes is Related to Bacterial Restriction Methyltransferases. *Journal of Molecular Biology* 203:971-983.
- *Bird, A.P.(1986). CpG RICH ISLANDS AND THE FUNCTION OF DNA METHYLATION. *Nature* 321(6067):209-213
- *Bird, A.P. (1987). DNA METHYLATION VERSUS GENE EXPRESSION. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 83(suppl):31-40.
- *Bjorkman, P.J., Saper, M.A. Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L y Wiley, S.C. (1987). STRUCTURE OF THE HUMAN CLASS I HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN, HLA-A2. *Nature* 329:506-512.
- *Bjorkman, P.J. y Parham, P. (1990). STRUCTURE FUNCTION, AND DIVERSITY OF CLASS I MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX MOLECULES. *Annual Reviews in Biochemistry* 59:253-288.
- *Boyes, J. y Bird, A. (1991). DNA METHYLATION INHIBITS TRANSCRIPTION INDIRECTLY VIA A METHYL CpG BINDING PROTEIN. *Cell* 64:1123-1134.
- *Campoy, F.J., Meechan, R.R., McKay, S., Nixon, J., Bird, A. (1995) BINDING OF HISTONE H1 TO DNA IS INDIFFERENT TO METHYLATION AT CpG SEQUENCES. *Journal of Biological Chemistry* 270:26473-81.
- *Cedar, H. y Razin A. (1990). DNA METHYLATION AND DEVELOPMENT. *Biochimica et Biophysica Acta* 1049:1-8.
- *Chomczynski y Sacchi (1987). SINGLE-STEP METHOD OF RNA ISOLATION BY ACID GUANIDIUM THIOCYANATE-PHENOL-CHLOROFORM EXTRACTION. *Annals of Biochemistry* 162(1):156-159.
- *Christman, J.K., Mendelsohn, N., Herzog, D. y Schneiderman, N. (1983). EFFECT OF 5-AZACITIDINE ON DIFFERENTIATION AND DNA METHYLATION IN HUMAN PROMYELOCYTIC LEUKEMIA CELLS (HL60). *Cancer Research* 43:763-769.
- *Clough, D.W., Kundel, L.M., Davidson, R.L. (1983). 5-AZACITIDINE INDUCED REACTIVATION OF *Herpes simplex* THYMIDINE KINASE GENE. *Science* 216:71-74.

- *Creusot, P., Acs, G. y Christman, J.K.(1982). INHIBITION OF ADN METHYLTRANSFERASE AND 5-AZA-2'-DEOXYCITIDINE. *Journal of Biological Chemistry* 257:2041-2048.
- *David-Watine, B., Israël, A. y Kourilsky, P. (1990). THE REGULATION AND EXPRESSION OF CLASS I GENES. *Immunology Today* 11(8):286-292.
- *De la Salle, H.Hanau, D., Fricker, D., Urlacher, A., Kelly, A. Salamero, J., Powis, SH, Donato, L., Bausinger, H., Laforet, M.,Jeras, M., Spehner, D., Bieber, T., Falkenrodt, A., Cazenave, J-P., Towsdale, J. y Tongio, M-M.(1994). HOMOZYGOUS HUMAN TAP PEPTIDE TRANSPORTER MUTATION IN HLA CLASS I DEFICIENCY. *Sciences* 265(5169):237-241.
- *Deverson, E.V., Gow, I.R., Coadwell, W.J, Monaco, J.J., Butcher, G.W. y Howard, J.C. (1990). MCH CLASS II REGION ENCODING PROTEINS RELATED TO THE MULTIDRUG RESISTANCE FAMILY OF TRANSMEMBRANE TRANSPORTERS. *Nature*,348(6303):738-741.
- *Eden, S. y Cedar, H. (1994). ROLE OF ADN MAETHYLATION IN THE REGULATION OF TRANSCRIPTION. *Current Opinion in Genetics and Development* 4:255-259.
- *Elliot, T., Cerundolo, A. y Townsend (1992). SHORT PEPTIDES ASSIST THE FOLDING OF FREE CLASS I HEAVY CHAINS IN SOLUTION. *European Journal of Immunology* 22(12):3121-3125.
- *Engelhard, V.H. (1994).STRUCTURE OF PEPTIDES ASSOCIATED WITH MHC CLASS I MOLECULES. *Current Opinion in Immunology* 6:13-23.
- *Evans G.A., Margulies, D.H., Camerini-Otero, R.D. Ozato, K. y Saidman, J.G. (1982).STRUCTURE AND EXPRESSION OF A MOUSE MAJOR HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN GENE H-2Ld. *Proceedings of the National Academy of Science. USA.* 79:1994-1998.
- *Evans, G.A., Margulies, D.H., Shykind, B., Seidman, J.G. y Ozato, K.(1982). EXON SHUFFLING: MAPPING POLYMORPHIC DETERMINANTS ON HYBRID MOUSE TRANSPLANTATION ANTIGENS. *Nature* 300:755-757.
- *Falk, K., Rotzschke,O., Stevanovic, S. y Jung, G. (1991). ALLELE-SPECIFIC MOTIFS REVEALED BY SEQUENCING OF SELF-PEPTIDES ELUTED FROM MHC MOLECULES. *Nature* 351(6324):290-296.

- *Fremont, D.H., Matsumura, M., Stura, E.A., Peterson, P.A. y Wilson, I.A. (1992). CRYSTAL STRUCTURE OF TWO VIRAL PEPTIDES IN COMPLEX WITH MURINE MHC CLASS I H-2K^b. *Science* 257:919-927.
- *Gambari, R., Del Senno, L., Barbieri, R., Viola, L., Tripodi, M., Raschellai, G. y Fantoni, A. (1986). HUMA NLEUKEMIA K562 CELLS: INDUCTION OF ERITHROID DIFFERENTIATION BY 5-AZACITIDINE. *Cell Diferentiation* 14:87-97.
- *Germain, R.N. (1994). MHC-DEPENDENT ANTIGEN PROCESSING AND PEPTIDE PRESENTAION: PROVIDING LIGANDS FOR T LYMPHOCYTE ACTIVATION. *Cell* 76:287-299.
- *Goldber, A.L. y Rock K.L. (1992). PROTEOLYSIS, PROTEASOMES AND ANTIGEN PRESENTATION. *Nature* 357(6377):375-379.
- *Henderson, R.A., Michel, H., Sakaguchi, K., Shabanowitz, J., Appella, E., Hunt, D.F. y Engelhars, V.H. (1992). HLA-A2.1 ASSOCIATED PEPTIDES FROM A MUTANT CELL LINE: A SECOND PATHWAY OF ANTIGEN RESENTATION. *Science* 255:1264-1266.
- *Higgins, C.F. (1992). ABC TRANSPORTER: From Microorganisms to Man. *Annual Reviews in Cell Biology* 8:67-113.
- *Holmes, D.S. y Quigley, M. (1981). A RAPID BOILING MEHTOD FOR THE PREPARATION OF BACTERIAL PLASMIDS. *Annal of Biochemistry* 114(1):193-197.
- *Hood, L., Steinmetz, M. y Malissen, B. (1983). GENS OF THE MAJOR HISTOCOMPTIBILITY COMPLEX OF THE MOUSE. *Annual Reviews in Immunology* 1:529-568.
- * Hunt, D.F., Henderson, R.A., Shabanowitz, J., Sakaguchi, K., Nichel, H., Sevilir, N., Cox, A.L., Apella, E. y Engelhard, V.H. (1992). CHARACTERIZATION OF PEPTIDES BOUND TO THE CLASS Y MCH MOLECULE HLA-A2.1 BY MASS SPECTROMETRY. *Sciences* 255(5049):1261-1263.
- *Ikuta, K. (1992). LYMPHOCYTE DEVELOPMENT FROM STEM CELLS. *Annual Reviews of Immunology* 10:759-783.
- *Jackson, M.R., Cohen-Doyle M.F., Peterson, P.A. y Williams, D.B. (1994). REGULATION OF MHC CLASS I TRANSPORT BY THE MOLECULAR CHAPERONE, CALNEXIN (p88, IP90). *Science* 263(5145):384-387.

- *Jackson, M.R. y Peterson, P.A. (1993). ASSEMBLY AND INTRACELULAR TRANSPORT OF MCH CLASS I MOLECULES. *Annual Reviews in Cell Biology* 9:207-235.
- *Jardetsky, J.S., Lane, W.S., Robinson, R.A., Madden, D.R. y Wiley, D.C. (1991). IDENTIFICATION OF SELF PEPTIDES BOUND TO PURIFIED HLA-B27. *Nature* 353(6342):326-329.
- *Jones, P.A. y Taylor, S.M. (1980). CELLULAR DIFERENTIATION, CYTIDINE ANALOGS, AND ADN METHYLATION. *Cell* 20:85-93.
- *Jones, P.A. y Buckley, J.D. (1990). THE ROLE OF METHYLATION IN CANCER. *Advances in Cancer Research* 54:1-23.
- *Kolsto, A.B., Kollins, G., Gignere, V., Isobe, K.J., Prydz, H. y Grosveld, F. (1986). THE MANTENANCE OF METHYLATION FREE ISLANDS IN TRANSGENIC MICE ADN METHYLATION IN TRANSGENIC MICE. *Nucleic Acids Research* 14:9667-9678.
- *Kovacsovic-Bankowski, M. y Rock, K.L. (1995). A PHAGOSOME-TO CYTOSOL PATHWAY FOR EXOGENOUS ANTIGENES PRESENTED ON MCH CLASS I MOLECULES. *Science* 367(5195):243-246.
- *Laird, P. W. (1996). THE ROLE OF ADN METHYLATION IN CANCER GENETICS AND EPIGENETICS. *Annual Reviews in Genetics* 30:441-64.
- *Lalanne, J.J., Delarbre, C., Cachelin, G. y Kourilsky, P. (1983). A cADN CLONE CONTAINING THE ENTIRE CODING SEQUENCE OF A MOUSE H-2Kd HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN. *Nucleic Acids Reseach* 11(5):1567-1577.
- *Lalanne, J.J., Cochet, M., Kummer, A.M., Cachelin, G. y Kourilsky, P. (1983). DIFFERENT EXON-INTRON ORGANIZATION AT THE 5'PART OF MOUSE CLASSI GENE IS USED TO GENERATE A NOVEL H-2Kd RELATED mARN. *Proccedings of the National Academy of Science. USA.* 80:7561-7565.
- *Lauster, R., Trautner, T.A. y Noyer-Weidner, M. (1989). CYTOSINE- SPECIFIC TYPE II ADN METHYLTRANSFERASES. A Conserved Enzyme Core with Variable Target-recognizing Domains. *Journal of Molecular Biology* 206:305-312.
- *Le Bouteiller, P. (1994). HLA CLASS I CHROMOSOMAL REGION, GENES, AND PRODUCTS: FACTS AND QUESTIONS. *Critical Reviews Immunology* 14(2):89-129.

- *Lewis, J.D., Meehan, R.R., Henzel, W.J., Maurer-Fogy, Y., Jeppesen, P., Klein, F. y Bird, A. (1992). PURIFICATION, SEQUENCE AND CELLULAR LOCALIZATION OF A NOVEL CHROMOSOMAL PROTEIN THAT BINDS TO METHYLATED DNA. *Cell* 69:905-914.
- *Ley, T.J., DeSimone, J., Anagnou, N.P., Keller, G.H., Humphries, K.R., Turner, P.H., Young, N.S., Heller, P. y Nienhuis, A.W. (1982). 5-AZACITIDINE SELECTIVELY INCREASES β -GLOBIN SYNTHESIS IN A PATIENT WITH β^+ THALASSEMIA. *The New England Journal of Medicine* 307(24):1469-1475.
- *Li, L.H., Olin, E.J., Fraser, T.J. y Bhuyan, B.K. (1970). PHASE SPECIFICITY OF 5-AZACYTIDINE AGAINST MAMMALIAN CELLS IN TISSUE CULTURE. *Cancer Research* 30:2773-2775.
- *Li, L.H., Olin, E.J., Buskirk, H.H. y Reineke, H.H. (1970). CYTOTOXICITY AND MODE OF ACTION OF 5-AZACITIDINE ON L1210 LEUKEMIA. *Cancer Research* 30:2760-2769.
- *Loyd, J., Brownson, C., Tweedie, S., Charlston, J. y Edwards, Y.H. (1987). HUMAN MUSCLE CARBONIC ANHYDRASE: GENE STRUCTURE AND DNA METHYLATION PATTERNS IN FETAL AND ADULT TISSUES. *Genes and Development* 1(6):594-602.
- *Maniatis, T., Fritsh, E.F. y Sambrook, J.K. (1982). MOLECULAR CLONING. A LABORATORY MANUAL. Cold Spring Harbor Laboratory, USA. Primera Edición 545 p.p.
- *Matsumura, M., Fremont, D.H., Peterson, P.A. y Wilson, I.A. (1992). EMERGING PRINCIPLES FOR THE RECOGNITION OF PEPTIDE ANTIGENS BY MHC CLASS I MOLECULES. *Science* 257(5072):927-934.
- *McCluskey, J., Boyd, L.F., Maloy, W.L., Coligan, J.Z. y Margulies, D.H. (1986). ALTERNATIVE PROCESSING OF THE H-2Dd PRE mRNA RESULTS IN MEMBRANE EXPRESSION OF DIFFERENTIALLY PHOSPHORYLATED PROTEIN PRODUCTS. *The EMBO Journal* 5(1):2477-2483.
- *Monaco, J.J. Cho, S. y Attaya, M. (1990). TRANSPORT PROTEIN GENES IN THE MURINE MHC POSSIBLE IMPLICATIONS FOR ANTIGEN PROCESSING. *Science* 250(4988):1723-1726.
- *Monaco, J. (1992). A MOLECULAR MODEL OF MHC CLASS II RESTRICTED ANTIGEN PROCESSING. *Immunology Today* 13(5):173-179.
- *Monaco, J. (1993). STRUCTURE AND FUNCTION OF GENES IN THE MHC CLASS II REGION. *Current Opinion in Immunology* 5:17-20.

- *Moore, M.W., Carbone, F.R. y Bevan, M.J.(1988). INTRODUCTION OF SOLUBLE PROTEIN INTO THE CLASS I PATHWAY OF ANTIGEN PROCESSING AND PRESENTATION. *Cell* 54(6):777-785.
- *Morrison, L.A., Lukacher, A.E., Braciale, V.L., Fan, D.P. y Braciale, T.J.(1986). DIFFERENCES IN ANTIGEN PRESENTATION TO MHC CLASS I AND CLASS II RESTRICTED INFLUENZA VIRUS-SPECIFIC CYTOLITIC T LYMPHOCYTE CLONES. *Journal of Experimental Medicine* 163(4):903-921.
- *Nava, G., Ocadiz, R. Ortega, V. y Alfaro, G. (1992). DAMAGE IN B2M GENES AND ADN METHYLATION OF H-2 GENES ARE INVOLVED IN LOSS OF EXPRESSION OF CLASS I MHC PRODUCTS ON THE MEMBRANE OF LR.4, A CELL LINE DERIVATIVE OF THE T-CELL LYMPHOMA L5178Y. *European Journal of Immunogenetics* 19:141-158.
- *Neddermann, P. y Jiriény, J.(1994). EFFICIENT REMOVAL OF URACIL FROM G.U MISPAIRS BY THE MISMATCH-SPECIFIC THYMINE ADN GLYCOSYLASE FROM HeLa CELLS. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 91:1642-46.
- *Neefjes, J.J. y Momburg, F. (1993). CELL BIOLOGY OF ANTIGEN PRESENTATION. *Current Opinion in Immunology* 5(1):27-34.
- *Openshaw, P. Murphy, E., Hosken, N.A., Maino, V., Davis, K., Murphy, K. y O'Garra, A. (1995). HETEROGENEITY OF INTRACELLULAR CYTOKINE SYNTHESIS AT THE SINGLE-CELL LEVEL IN POLARIZED T HELPER 1 AND T HELPER 2 POPULATIONS. *Journal of Experimental Medicine* 182(5):1357-1367.
- *Orloski, M. (1990). THE MULTICATALITIC PROTEINASE COMPLEX, A MAJOR EXTRALYSOSOMAL PROTEOLYTIC SYSTEM. *Biochemistry* 29(45):10289-10297.
- *Pan-Yung, T. J. y Baldwin, S.A. (1993). REGULATION OF MHC GENE EXPRESSION. *Current opinion in Immunology* 5:8-16.
- *Parham, P. (1992). DECONSTRUCTING THE MHC. *Nature* 360(6402):300-301.
- * Parnes, J.R., Sizer, K.C., seidman, J.G, Stallings V y Hyman, R. (1986). A MUTAIONAL HOT-SPOT WITHIN AN INTRON OF THE MOUSE B2MICROGLOBULINE GENE. *The EMBO Journal* 5(1):103-111.
- *Pinto, A. y Zagonel, V.(1993). 5-AZA-2'-DEOXYCYTIDINE (DECITABINE) AND 5-AZACITIDINE IN THE TREATMENT OF ACUTE MYELOID LEUKEMIAS AND MYELODYSPLASTIC SYNDROMES: PAST, PRESENT AND FUTURE TRENDS. *Leukemia* 7(suppl. monograph 1):51-60.

- *Pinto, A., Attadia, V., Fusco, A. Ferrera, F. Spada, O.A. y Di Fiore, P.P. (1984). 5-AZA-2'-DEOXYCYTIDINE INDUCES TERMINAL DIFFERENTIATION OF LAUKEMIC BLASTS FROM PATIENTS WITH ACUTE MYELOID LAUKEMIA. *Blood* 64:922-929.
- *Pósfai, J. Bhagwat, A.S., Pósfai, G. y Roberts, R.J. (1989). PREDICTIVE MOTIFS DERIVED FROM CYTOSINE METHYLTRANSFERASES. *Nucleic Acids Research* 17(7):2421-2435.
- *Razin, A. y Riggs, A.D. (1980). ADN METHYLATION AND GENE FUNCTION. *Science* 210:604210.
- *Riggs, A.D. y Jones, P.A. (1983). 5-METHYLCYTOSINE, GENE REGULATION, AND CANCER. *Advances in Cancer Research* 40:1-30.
- *Sanger, R. y Kovac, P. (1982). PRE-ADIPOCITE DETERMINATION EITHER BY INSULIN OR BY 5-AZACITIDINE. *Proceedings of the National Academy of Science. USA.* 79:480-484.
- *Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). MOLECULAR CLONING. A LABORATORY MANUAL. Cold Sping Harbor Laboratory Press. USA. Segunda Edición Tomo I y II.
- *Santi, D.V. Noorment, A. y Garret, C.E. (1984). COVALENT BOND FORMATION BETWEEN A ADN-CYTOSINE METHYLTRANSFERASE AND ADN CONTAINING 5-AZACITOSINE. *Proceedings of the National Academy of Science. USA.* 81:6993-6997.
- *Santoro, R., D'Erme, M., Mastrantonio, S., Reale, A., Marenzi, S. (1995). BINDING OF HISTONE H-1e-c VARIANTS TO CpG-RICH ADN CORRELATES WITH THE INHIBITORY EFFECT ON ENZYMIC ADN METHYLATION. *Biochemistry Journal* 305:739-44.
- *Sege, K., Rask, L. y Peterson, P.A. (1981). ROLE OF BETA 2-MICROGLOBULIN IN THE INTRACELULAR PROCESSING OF HLA ANTIGENS. *Biochemistry* 20(16):4523-4530.
- *Seiler-Tuyns, A., Birnstiel, M.L. (1981). STRUCTURE AND EXPRESSION IN L-CELLS OF A CLONED H4 HISTONE GENE OF THE MOUSE. *Journal of Molecular Biology.* 151:607-625.
- *Shemer, R., Eisenberg, S., Breslow, J.L. y Razin, A. (1991). METHYLATION PATTERNS OF THE HUMAN ApoA-I/C-III/A-IV GENE CLUSTER IN ADULT AND EMBRYONIC TISSUES SUGGESTS DYNAMIC CHANGES IN METHYLATION DURING DEVELOPMENT. *Journal of Biological Chemistry* 266(35):23676-23681.

- *Singer, D.S. y Maguire, J.E. (1990). REGULATION OF THE EXPRESSION OF CLASS I MHC GENES. *Critical Reviews in Immunology* 10(3):235-257.
- *Smith, M.H. y Barber, B.H. (1990). THE CONFORMATIONAL FLEXIBILITY OF CLASS I H-2 MOLECULES AS REVEALED BY ANTI-PEPTIDE ANTIBODIES SPECIFIC FOR INTRACYTOPLASMIC DETERMINANTS:DIFFERENTIAL REACTIVITY OF BETA 2-MICROGLOBULIN "BOUND" AND "FREE" H-2KB HEAVY CHAINS. *Molecular Immunology* 27(2):169-180.
- *Spies, T., Bresnahan, M., Braham, S., Arnold, D., Blanck, G., Mellins, E., Pious, D. y De Mars, R. (1990) A GENE IN THE HUMAN MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS II REGION CONTROLLING THE CLASS I ANTIGEN PRESENTATION PATHWAYS. *Nature* 348(6303):744-747.
- *Spies, T. y DeMars, R. (1991). RESTORED EXPRESSION OF MAJOR HISTOCOMPATIBILITY CLASS I MOLECULES BY GENE TRANSFER OF A PUTATIVE PEPTIDE TRANSPORTER. *Nature* 351:323-324.
- *Stallings, R. L., Siciliano, M.J., Frazier, M.L., Al-Ubaidi, M.R. y Kellems, R. (1989). HYPOMETHYLATION AND ADA Gen EXPRESSION IN MOUSE CAK CELLS. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 15(1):1-12.
- *Strom, R., Santoro, R., D'Erme, M., Mastrantonio, S., Reale, A. (1995). SPECIFIC VARIATIONS OF H1 HISTONE REGULATE CpG METHYLATION IN EUKARYOTIC ADN. *Gene* 157:253-56.
- *Suh, W-K, Cohen-Doyle, M.F., Fruh, K., Wang, K., Peterson, PA. y Williams, D.B. (1994). INTERACTION OF MHC CLASS I MOLECULES WITH THE TRANSPORTER ASSOCIATED WITH ANTIGEN PROCESSING. *Science* 264(5163):1322-1326.
- *Tate, P. y Bird, A. (1993). EFFECTS OF ADN METHYLATION ON ADN-BINDING PROTEINS AN GENE EXPRESSION. *Current Opinion in Genetics and Development* 3:226-231.
- *Thomas, P. (1980). HYBRIDIZATION OF DENATURES ARN AND SMALL ADN FRAGMENTS TRANSFERRED TO NITROCELLULOSE. *Proceedings of the National Academy of Science. USA* 77(9):5201-5205.
- *Trowsdale, J., Hanson, I., Mookridge, I., Beck, S., Townsend, A. y Kelly, A. (1990). SEQUENCE ENCODED IN THE CLASSII REGION OF THE MHC RELATED TO THE "ABC" SUPERFAMILY OF TRANSPORTERS. *Nature* 348(6303):741-744.