

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

“Clonación de tres diferentes fragmentos del promotor del factor de transcripción E2F-1 en el vector pBluescript SK+”

TESIS

Que para obtener el título de:

BIÓLOGA

Presenta:

Corina Silva Alvarez

Asesor: Dr. José Segovia

Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del IPN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

*Esta tesis se realizó en el laboratorio 37 del departamento de Fisiología,
Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigaciones y Estudios
Avanzados (CINVESTAV) del IPN, bajo la asesoría del Dr. José Segovia.*

Señor:

*Ayúdame a encontrar la fortaleza del viejo roble,
para que ningún triunfo me envanezca.
La alegría de la naturaleza,
para que ninguna soledad me abata.
La libertad del ave,
para elegir mi camino
Y la voluntad del expedicionario,
para seguir siempre adelante, y servir*

(oración del expedicionario)

Dedicatoria

A mis padres, Ma. del Carmen y Francisco, por todo el amor que me dan día a día, por el esfuerzo que han dedicado para que yo pueda realizar mis sueños y por estar siempre cerca de mí, gracias por creer en mi y por disfrutar las cosas que me hacen feliz.

A mis hermanas Marlene y Paola, por sus oídos y su corazón, las risas, los llantos y la compañía en las noches de desvelo, su paciencia y su apoyo incondicional; me siento muy afortunada de compartir mi vida con ustedes.

Agradecimientos

Al Dr. José Segovia por su confianza, entusiasmo, enseñanzas y el apoyo para realizar este proyecto académico y personal.

A la Q.B.P. Paula Vergara y a Rubén, por su paciencia, atención y compañía a lo largo de la realización de este proyecto.

A mis sinodales Dr. Diego Arenas, Dr. Jorge Eduardo Campos y Dr. Ricardo Mejía por sus sugerencias y comentarios para presentar un mejor trabajo. Quiero agradecer de forma especial al Dr. Sergio Vaca por iniciar conmigo este proyecto antes que nadie al enfrentarme a un escalón importante en mi vida tanto académica como personal.

A mis compañeros de laboratorio: Francis, Absalóm y Betzabet, por su compañía y apoyo. De forma particular a Alejandro y Leticia por sus sugerencias y enseñanzas durante la realización del trabajo.

Al Biol. Alejandro Monsalvo del laboratorio de Bioquímica de la unidad de Biotecnología y prototipos (UBIPRO) de la FES Iztacala, por su ayuda y sugerencias en la secuenciación.

A mi compañera de batallas Selene, por su amistad, paciencia y apoyo diario, por estar a mi lado en toda circunstancia y por permitirme crecer junto con ella durante la carrera. A Daniel, por creer en nosotras.

A José Luis y a Omar por escucharme, quererme y hacerme sonreír.

A mis amigas Judy, Karla, Lizet, KACHY, Bere y Dalia por estar conmigo sin importar la distancia ni el tiempo.

A mis amigos Enrique y Oscar, por estar al pendiente de mí y por alentarme a seguir adelante.

A Aldo por la visión alternativa que puede tener la vida, y el cariño.

A Victor, por sus comentarios finales y ayuda en el escrito de la tesis.

A mis tutores y asesores en la carrera: Biol. Beatriz Rubio, M. en C. Rodolfo Cárdenas, Biol. Mónica Chávez, Biol. Roberto Rico y Biol. José del Carmen Benítez por las enseñanzas para mi formación académica.

Indice

Indice	5
Lista de abreviaturas	6
Introducción	8
Clasificación de tumores astrocíticos	8
Orígenes celulares de los gliomas	9
Manifestaciones clínicas de los gliomas.	16
Tratamientos para gliomas y tumores cerebrales	17
Terapia génica: alternativa terapéutica para tratamiento de gliomas	18
Diseño de promotores para transgenes con especificidad celular	19
Factores de transcripción E2F: su implicación en el ciclo celular y el cáncer.	19
E2F como activador transcripcional	20
Autorregulación de E2F-1	22
Promotor de E2F-1 en terapia génica.	22
Objetivos	25
Material y métodos	26
I. Clonación del plásmido pBlueE2F-Short	26
II. Clonación del plásmido pBlueE2F-Large	29
III. Clonación del plásmido pBlueE2F-P	30
IV. Secuenciación de los plásmidos pBlueE2F	32
Resultados	33
Amplificación de los fragmentos E2F-Short y E2F-Large mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	33
Clonación del fragmento E2F-Short en el plásmido pBluescript SK+.	33
Clonación del fragmento E2F-Large en el plásmido pBluescript SK +	39
Clonación del fragmento E2F-P en el plásmido pBluescript SK+	44
Discusión	47
¿Por qué clonar tres fragmentos diferentes del promotor E2F-1?	50
Conclusiones	52
Perspectivas	52
Apéndice 1	53
Apéndice 2	54
Referencias	55

Lista de abreviaturas

AAV	Virus adenoasociado
Ad	Adenovirus
ADN	Acido desoxiribonucleico
AKT	Familia de cinasas de serina-treonina
ARF	Marco de lectura alternativo
CDC2	Gen que codifica para INK4a y p19ARF
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas
CDK4	Cinasa 4 dependiente de ciclina
CDNK2	Cinasa 2 dependiente de ciclina
CKI	Inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas
CMV	Citomegalovirus
DP	Componente heterodimérico de E2F
E2F	Familia de factores de transcripción E2F
EGF	Factor de crecimiento epitelial
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epitelial
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos
G0	Gap 0 (fase del ciclo celular)
G1	Gap 1 (fase del ciclo celular)
GBM	Glioblastoma multiforme
HDAC	Desacetilasa de histonas
HPV	Virus del papiloma humano
HSV	Virus del herpes simple
INK4a o p16	Inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas
KIP1 o p 27	Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina
LOH	Pérdida de heterocigocidad
MAPK	Cinasas activadas por mitógenos
MBF-1	Factor de transcripción
MDM2	Oncogen
Mxi1	Proteína antagonista de proteínas Myc
NFκ-B	Factor de transcripción
NK	Células citotóxicas naturales
ORC1	Proteína del complejo de inicio de la replicación
p53	Proteína supresora de tumores p53
PCNA	Antígeno de proliferación nuclear
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDGFR	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3	Fosfatidil inositol 3'
PLK	Cinasa (Polo-like kinase)
pRB	Proteína del retinoblastoma
PRC1	Complejo represor (Polycomb repressive complex 1)

PTEN	Proteína supresora de tumores del cromosoma 10q
RAS	Via de señalización para la inducción de CKIs
RTK	Receptores con función de Tirocín cinasas
S	Síntesis (fase del ciclo celular)
SNC	Sistema nervioso central
SP1	Factor de transcripción
SV40	Virus de mono
TGF- α	Factor de crecimiento tumoral
VEGF-B	Factor de crecimiento del endotelio vascular
WHO	Organización mundial de la salud

Introducción

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) tienen características especiales que los hacen diferentes de otros neoplasmas en el cuerpo. Primero, la distinción entre tumores benignos y malignos es menos evidente; segundo, a pesar de la clasificación histológica, pueden ser altamente dañinos, dependiendo de su localización anatómica y, rara vez realizan metástasis fuera del SNC a pesar de que se infiltran en el parénquima cerebral circundante (Castro et al., 2003).

Los tumores primarios del cerebro que provienen de células del sistema nervioso central son clasificados como neuroepiteliales si se originan de células neuronales, gliales o neurogliales. Estos tumores cerebrales primarios tienen una distribución bimodal, con un pico temprano en la infancia entre los 5 y 9 años y el segundo mucho más alto, entre los 60 y 69 años; estos tumores son el segundo tipo de cáncer en niños menores a los 15 años y la tercera causa de muerte relacionada con cáncer en adultos de alrededor de 34 años, pero la mayoría de estos tumores aparecen a partir de la quinta década de vida (Castro et al., 2003).

La incidencia aproximada de varios tipos de tumores neuroepiteliales en adultos es aproximadamente: para glioblastoma multiforme (GBM) 50%, astrocitoma anaplásico 30%, oligodendroglioma 6%, astrocitoma no anaplásico 5%, tumores de células ependimales 4%, meduloblastomas 2% y otros tipos de tumores 1% (Tatter y Harsh IV, 1998).

Clasificación de tumores astrocíticos

La prognosis y los acercamientos terapéuticos para los tumores cerebrales dependen en gran medida del tipo histológico del tumor y la edad del paciente. La Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés) ha desarrollado una clasificación para tumores del SNC basada en una escala de malignidad (del grado I al grado IV).

Los tumores de Grado I son benignos y pueden ser tratados quirúrgicamente; los tumores de Grado II son de malignidad de bajo grado y pueden seguir cursos clínicos largos, pero no son curables por cirugía. Los tumores de Grado III son malignos, causando la muerte en pocos años y, los tumores de Grado IV son altamente malignos, usualmente resistentes a la quimioterapia y son letales entre nueve y doce meses después de su diagnóstico (Maher et al., 2001).

La clasificación para los gliomas de origen astrocítico muestra una gran variación en morfología y en comportamiento biológico (Fig. 1).

El astrocitoma pilocítico representa el tumor más común en infantes; usualmente se encuentra claramente demarcado y rara vez progresa a anaplasia, corresponde a gliomas de Grado I de acuerdo a la clasificación de WHO.

El astrocitoma de bajo grado (WHO Grado II) usualmente muestra infiltración extensiva, en pacientes adultos recurren casi invariablemente después de un tratamiento quirúrgico, tienen un fuerte potencial para la progresión maligna hacia los Grados III y IV .

El Grado III de la WHO corresponde al astrocitoma anaplásico, el cual se caracteriza por tener una alta densidad celular y una actividad mitótica incrementada, además puede contener áreas que correspondan a un grado menor, indicando el origen de una lesión precursora de menor grado.

El último tumor de ésta clasificación es el glioblastoma multiforme (GBM) que corresponde a la clasificación WHO grado IV. Este es el tumor cerebral más frecuente y de mayor malignidad, son tumores agresivos que pueden desarrollarse *de novo* (glioblastoma primario) o a través de progresión de gliomas de menor grado (glioblastoma secundario). Estos tumores son altamente proliferativos y esto les confiere características como un dramático crecimiento celular del tumor, migración extensiva y angiogénesis prominente (Plate y Risau 1995, Pietsch y Wiestler 1997).

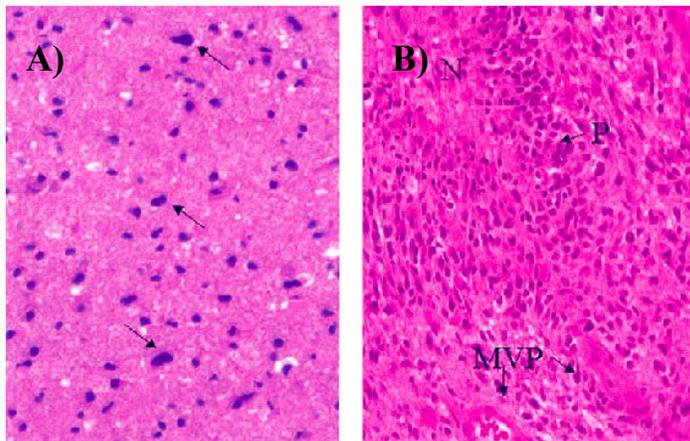


Figura 1: Diferencia histopatológica entre gliomas de diferentes grados. A) astrocitoma WHO grado II, las flechas indican el incremento de células neoplásicas con núcleos elongados. B) GBM donde se observa mayor cantidad de células, áreas necróticas (N), núcleos en empalizada (P) y proliferación microvascular (MVP)

(Maher et al. 2001)

Orígenes celulares de los gliomas

Existen dos vías involucradas en el fenómeno de gliomagénesis que corresponden a los dos subtipos de GBM, el glioblastoma multiforme

primario y el secundario, los cuales representan dos entidades clínicamente diferentes (Fig 2). Las lesiones moleculares entre estos dos subtipos de GBMs son diferentes pero las vías bioquímicas alteradas que se conocen hasta ahora son las mismas, incluso, la supervivencia media desde que se establece un GBM no difiere estadísticamente, lo que refleja la similitud de proliferación e invasión, así como resistencia a las diferentes modalidades terapéuticas (Maher et al. 2001).

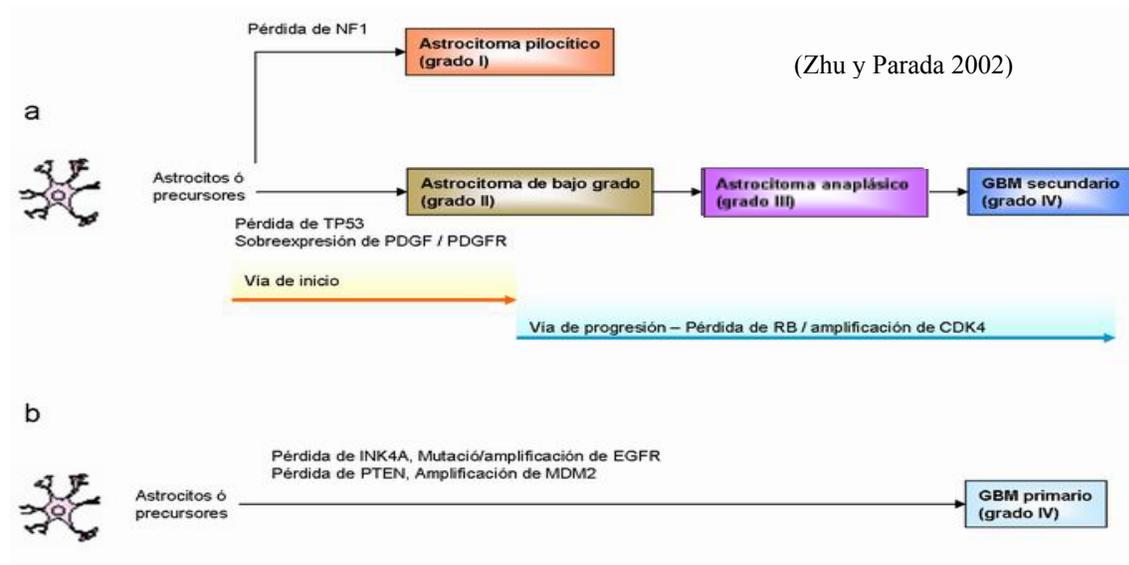


Figura 2: Vías moleculares involucradas en el desarrollo de gliomas primarios y secundarios. A) vías involucradas en la iniciación y progresión de GBM secundario. Por ejemplo, pérdida de p53 y sobreexpresión de PDGF/PDGFR, en astrocitomas de grado I y II, la progresión hacia GBM está asociada con la interrupción de la vía de pRB. B) En GBM primario, las mismas vías se encuentran alteradas aunque por diferentes mecanismos. Por ejemplo, sobreexpresión de MDM2 en la vía de p53, interrupción de la vía de pRB por pérdida de INK4a, amplificación o mutación de EGFR. La interrupción en la actividad de PTEN también es característica de este tipo de tumores.

Las mutaciones principales de los GBMs se encuentran en componentes del ciclo celular, así como en la vía apoptótica y en la desregulación del crecimiento (Fig 3).

Vía de factores de crecimiento PDGF y EGF

Análisis genéticos de astrocitomas muestran expresiones elevadas de factores de crecimiento y/o de sus receptores RTK (siglas en inglés de receptores con actividad de tirosín cinasas), por lo que la señalización

mediada por RAS se encuentra involucrada en la iniciación del desarrollo de astrocitomas (Holland 2001).

En los gliomas se ha observado la sobreexpresión del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) y de su receptor PDGFR α lo que se ha relacionado con la Pérdida de Heterocigocidad (LOH, siglas en inglés) del cromosoma 17p (Hermanson et al. 1996). Esta alteración se encuentra en astrocitomas de cualquier grado; la coexpresión de este factor de crecimiento y de su receptor en las mismas células tumorales indican que se establece un efecto autócrino estimulador.

Por otro lado, la amplificación del gen del Receptor del Factor de Crecimiento Epitelial (EGFR) se encuentra en aproximadamente el 40% de los GBMs primarios, pero es poco común en los secundarios y la baja frecuencia en astrocitomas anaplásicos sugiere que la activación de EGFR puede ser responsable de estimular los procesos de transformación hacia GBM.

En el GBM también se sobreexpresan los ligandos endógenos EGF y TGF- α (factor de crecimiento tumoral α) lo que también sugiere un efecto autócrino estimulador. Además de la sobreexpresión de EGFR, también existen variantes mutantes de éste, las cuales carecen del dominio de unión al ligando pudiendo así, autofosforilarse de manera constitutiva (Maher et al. 2001, Zhu y Parada 2002).

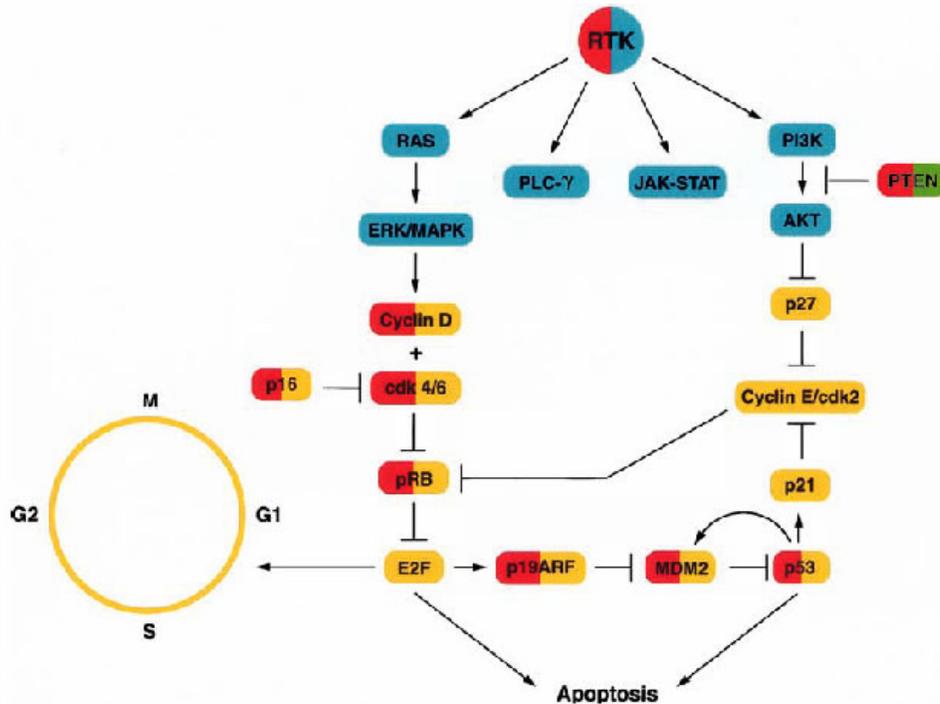
Vía de p53

p53 es una proteína supresora de tumores la cual funciona como un factor de transcripción que regula la progresión del ciclo celular y es también un inductor de la muerte celular programada o “apoptosis” en respuesta a diferentes daños al ADN y mutaciones.

La inactivación de p53 puede afectar dos fases de la gliomagénesis: primero, en la formación de un tumor de bajo grado y posteriormente, facilitando la progresión hacia la malignidad (Bögler et al. 1995). Algunas de las alteraciones de p53 en GBMs se ven reflejadas citogenéticamente en LOH del cromosoma 17p (Hermanson et al. 1996).

La actividad transcripcional de p53 es regulada por su interacción con otras proteínas, tal es el caso de MDM2 que regula a p53 de forma negativa. Cuando existe interacción entre éstas proteínas, se enmascara el dominio de activación transcripcional de p53 (Bögler et al. 1995). MDM2 también funciona como Ubiquitina ligasa E3, teniendo un papel crítico en la ubiquitinación y degradación proteosomal de p53.

Alrededor del 10% de los gliomas de grado III que cuentan con la proteína p53 intacta, presentan una amplificación del gen MDM2 lo que lleva a suponer que se trata de un mecanismo alternativo a la pérdida de función de p53 (Collins 1995).



(Maher et al. 2001)

Figura 3: Integración de las vías mutadas en los GBMs.

RTK es activado por PDGR o EGF, las señalizaciones pueden continuar por diferentes vías de las cuales, Ras y PI3-K influyen en la maquinaria del ciclo celular en diferentes niveles. En azul se muestran las vías de RTK, en amarillo los componentes del ciclo celular, en verde la vía de PTEN y en rojo están señaladas las vías mutadas en los gliomas malignos.

En condiciones normales, la inhibición de la proteína MDM2 se lleva a cabo por la interacción de la proteína p19^{ARF} (ARF: marco de lectura alternativo al del inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas INK4a) con MDM2, lo que evita la degradación de p53.

En los gliomas, la inactivación del gen (CDKN2) que codifica para p19^{ARF} ha sido reportada con una frecuencia aproximada del 57% (Maher et al. 2001), lo que sugiere que la pérdida de la regulación negativa de MDM2 puede ser un mecanismo alternativo a la amplificación del gen de MDM2 mencionado anteriormente.

Supresor de tumores del cromosoma 10q PTEN

LOH del cromosoma 10q es una característica citogenética que afecta del 75% al 90% de los GBMs. Algunos *loci* asociados a estos tumores han sido identificados en esta región, entre ellos se encuentra PTEN (proteína con función de fosfatasa de lípidos y proteínas). En GBMs primarios, la inactivación de PTEN tiene una incidencia de alrededor del 30%, mientras que en GBMs secundarios es muy baja, aproximadamente 4%.

PTEN posee actividad de proteín fosfatasa y 3' fosfoinositol fosfatasa, por lo que PTEN puede funcionar como regulador negativo de la vía de señalización PI3-AKT que regula la actividad de una variedad de proteínas que juegan papeles importantes en la proliferación y en la sobrevivencia (Wechsler-Reya y Scott 2001, Holland 2001).

Otro gen candidato como supresor de tumores en la región de LOH del cromosoma 10q es Mx1, que es un importante antagonista de las oncoproteínas Myc. En un 15% de astrocitomas de alto grado se ha encontrado inactivación del gen Mx1, mientras que en astrocitomas de bajo grado la inactivación de Mx1 no ha sido reportada (Maher et al. 2001, Zhu y Parada 2002).

La pérdida de heterocigidad del cromosoma 10q está frecuentemente asociada con la amplificación de EGFR en GBMs primarios, dejando la posibilidad de que la interacción entre la señalización de EGFR y una de las vías de los genes supresores de 10q puedan estar involucrados en algunas de las características agresivas del GBM (Von Deimling et al. 1995, Maher et al. 2001, Zhu y Parada 2002).

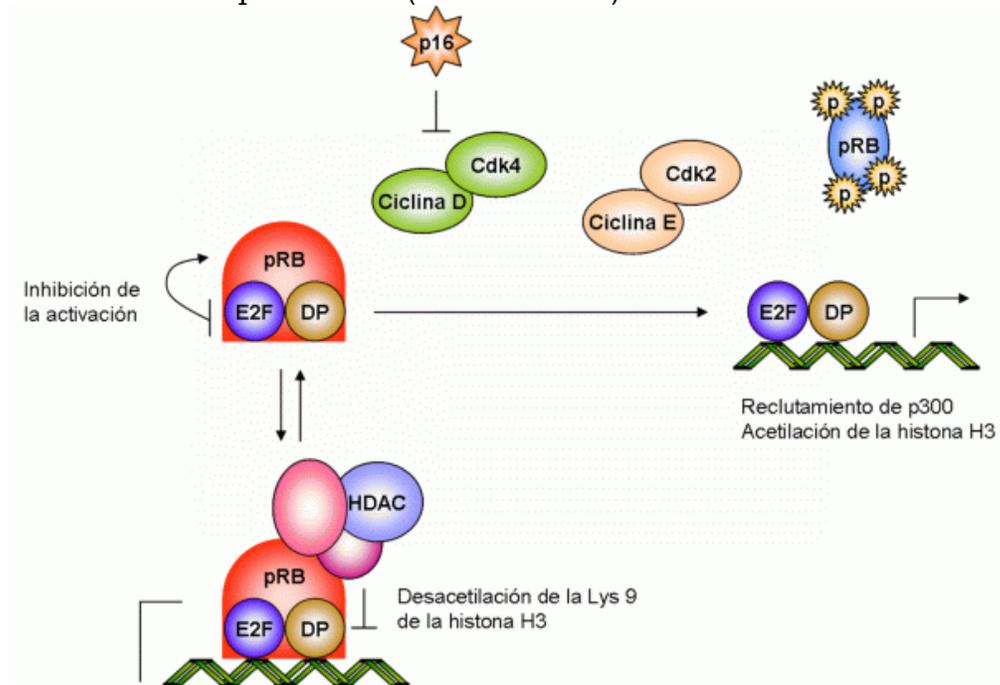
La vía de Rb (RB, CDK4/6 e INK4a)

El incremento de la proliferación celular es un fenómeno característico en la transformación de gliomas de bajo grado a gliomas intermedios y está relacionado en gran parte con la desregulación de la vía de la proteína del retinoblastoma (pRB).

pRB es una proteína catalogada como supresora de tumores debido al papel que juega en el ciclo celular, gracias a su capacidad de reprimir la transcripción por dos mecanismos diferentes (Fig. 4). En el primero, pRB se une a factores de transcripción de la familia E2F y bloquea su habilidad para activar la transcripción. El segundo mecanismo es por complejos que pRB forma junto con E2F y con co-represores como las desacetilasas de histonas (HDACs), las cuales remueven grupos acilo de las colas de octámeros de las histonas, facilitando la condensación de nucleosomas a cromatina e inhibiendo la expresión génica, bloqueando así el acceso de

otro tipo de factores de transcripción que se encuentran en los promotores (Harbour y Dean 2000, Adams 2001).

pRB pertenece a una familia de proteínas llamadas “pocket” (pRB, p107 y p130) debido a que dentro de su estructura se encuentra un sitio de unión conservado (pocket) al que se unen factores de transcripción E2F, desacetilasas de histonas; proteínas virales como E1a (de adenovirus), E7 (de HPV, virus del papiloma humano), antígeno T (de SV40, virus de mono) que al unirse al sitio “pocket” interrumpen la interacción entre pRB y los factores de transcripción E2F (Adams 2001).



Trimarchi y Lees 2002

Figura 4: Mecanismos de represión de la transcripción por pRB.

pRB se une a complejos E2F-DP en G0/G1 y reprime la expresión de algunos genes que responden a E2F mediante dos mecanismos. En el primero, pRB inhibe la transcripción activada por E2F uniéndose en su sitio de transactivación. En el segundo, el complejo se une a los promotores de genes que responden a E2F y “activan la represión” formando complejos E2F-pRB-HDAC.

Esta familia de proteínas también cuenta con sitios de fosforilación alrededor del sitio “pocket” por lo que cuando estas proteínas se fosforilan, el factor de transcripción E2F es liberado y puede activar la transcripción de varios genes esenciales para la división celular (como ciclina E, ciclina A, c-myb, b-myb, pRB, E2F-1), enzimas involucradas en la biosíntesis de nucleótidos (dihidrofolato reductasa, timidilato sintetasa, timidina cinasa) y componentes principales de la maquinaria de replicación del ADN (ADN polimerasa α) (Trimarchi y Lees 2002, Wells 2000).

La fosforilación de pRB está regulada por complejos de ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La fosforilación de pRB se inicia por el complejo ciclina D-cdk4/6 como respuesta temprana a la estimulación de factores de crecimiento, liberando a E2F durante la mitad de la fase G1; el inhibidor de las cinasas dependientes de ciclinas (CKI) INK4a regula la fosforilación de pRB bloqueando la activación del complejo ciclina D-Cdk4/6 uniéndose a Cdk4 o Cdk6.

El proceso de fosforilación es acelerado por complejos de ciclina E-Cdk2 en la transición de G1 a S debido a que la transcripción, tanto de ciclina E como de Cdk2, son regulados por E2F creando una retroalimentación positiva que facilita una mayor liberación de E2F. Durante la fase S los complejos de ciclina A-Cdk2 mantienen a pRB de forma fosforilada para así evitar la recaptura de E2F hasta que se completa la mitosis. Posteriormente, los complejos de ciclina A-cdk2 son capaces de interrumpir la transcripción de E2F haciendo complejos ciclina-cdk2-E2F para fosforilar DP-1 (componente heterodimérico de E2F) y evitar la unión de E2F al ADN una vez que las células entran a fase S (Dymlach et al. 1994, Sherr 1996)

Una característica de los gliomas es su alta actividad mitótica, y en gran parte se debe a la interrupción de circuitos reguladores pRB-CDK-CKI.

En los GBMs la inactivación de INK4a (conocido como p16, que junto con p19^{ARF} están codificados por el gen CDKN2) debida a mutaciones de supresión homocigótica (en el cromosoma 9q), pérdida de heterocigocidad o mutaciones han sido reportadas con una frecuencia del 40 al 57% (Ueki et al. 1996, Zhu y Parada 2002)

Por otro lado, dentro del amplicón 12q se ha observado el aumento de la expresión de diferentes genes, pero el que se encuentra amplificado de forma consistente es el gen CDK4. El aumento en la expresión del gen CDK4 se ha encontrado en aproximadamente el 15% de los GBMs (Collins 1995, Maher et al. 2001). La inactivación de pRB ha sido identificada en 14% a 33% de GBMs.

Las observaciones que relacionan la inactivación de INK4a, pRB y la sobreexpresión de CDK4 en GBMs han demostrado que se trata de fenómenos alternativos y, que la mutación de cualquier componente de la vía INK4a-Cdk4-pRB puede tener efectos equivalentes. En total, las mutaciones en esta vía han sido detectadas en más del 80% de GBMs y en 50% de astrocitomas anaplásicos (Zhu y Parada 2002, He et al. 1994, Ueki et al. 1996). Los GBMs que carecen de mutaciones detectables en la vía INK4a-cdk4-pRB pueden tener mutaciones en otros componentes de esta

vía como es la sobreexpresión de Cdk6 o de la ciclina D (Zhu y Parada 2002).

La identificación de las alteraciones moleculares junto con los conocimientos histopatológicos de los gliomas, han permitido discernir las vías moleculares involucradas en el desarrollo y la progresión de estos tumores, por lo que pueden servir para un diagnóstico más acertado con respecto a su origen y su posible tratamiento clínico. Así mismo, conforme el conocimiento molecular de estos mecanismos se vaya aclarando, existirán mayores posibilidades para desarrollar terapias moleculares efectivas para los gliomas.

Manifestaciones clínicas de los gliomas.

No sólo la malignidad de los tumores determina los efectos que tienen sobre los pacientes, la localización del tumor en el cerebro, el patrón de crecimiento y la velocidad de crecimiento también son características importantes que se ven reflejadas en los síntomas y signos de los pacientes.

Los datos clínicos de los gliomas son los mismos que para cualquier tumor intracraneal. Se presenta hipertensión endocraneana de grado variable, ésta es originada por el volumen tumoral *per se*, o por el bloqueo mecánico en la circulación del líquido cefalorraquídeo (Tatter y Harsh IV 1998).

En estadios iniciales el síntoma predominante es la cefalea, en etapas más avanzadas del crecimiento tumoral se puede presentar papiledema, vómito y la cefalea persiste. La sola presencia de la masa tumoral puede originar descargas neuronales anormales que se manifiestan como crisis epileptiformes; si comprime algún núcleo nervioso o el trayecto de un fascículo o par craneal se presentará disfunción motora o sensorial; en particular, los gliomas infiltrativos pueden causar trastornos en la función cerebral y en la memoria, función mental y/o personalidad (Laws JR. y Shaffrey 1999).

Los efectos parenquimatosos que causan estos tumores incluyen la compresión, invasión, destrucción del tejido cerebral circundante y pérdida de la autorregulación arterial. La hipoxia, la competencia por nutrientes, alteración metabólica de neurotransmisores y electrolitos y la mayor cantidad de citocinas y radicales libres presentes alteran el ambiente celular evitando la función normal de las células vecinas.

Tratamientos para gliomas y tumores cerebrales

Terapia farmacológica.- Los corticoesteroides inducen una mejoría sintomática en los pacientes causando una reducción en el edema peritumoral; la inhibición del crecimiento del tumor es evidente así como el incremento en el tiempo del ciclo celular, pero no se produce muerte celular.

Cirugía.- Es la principal terapia inicial y mediante la cual también se obtienen muestras para el diagnóstico histológico. El criterio empleado para realizar una intervención de este tipo depende de la necesidad de disminuir los síntomas por una reducción de la presión intracraneal y/o por control oncológico. La infiltración de las células del tumor en el tejido cerebral circundante hace imposible una eliminación total, aunque la extirpación parcial puede proveer una ventaja en la sobrevivencia y deja un menor número de células que potencialmente podrían adquirir mutaciones adicionales.

Radioterapia.- Las radiaciones ionizantes empleadas en esta técnica son citotóxicas y causan daño inducido por iones a las enzimas celulares y al ADN. La mayor sensibilidad a estas radiaciones se encuentra durante la parte final de la fase G1 y principios de la fase S del ciclo celular.

La radioterapia es comúnmente empleada después de la cirugía y en la mayoría de las ocasiones se aplica de manera fraccionada ya que puede ayudar al control de células tumorales aisladas que han migrado dentro del cerebro durante el proceso de invasión. El riesgo de efectos secundarios debidos a la radiación depende del promedio, la dosis total, el volumen y la naturaleza iónica de la radiación administrada.

Quimioterapia.- El cerebro cuenta con la barrera hematoencefálica, la cual limita el acceso de algunos agentes quimioterapéuticos hacia los tumores. Para solucionar este problema se han empleado agentes que son capaces de cruzar la barrera haciéndola más permeable para conseguir una mejor difusión de los quimioterapéuticos utilizados junto con la radioterapia como estrategia para tratar el tumor residual.

Inmunoterapia.- Estrategias de este tipo se han utilizado como adyuvantes para el tratamiento de tumores cerebrales. Estos tratamientos se suministran en forma de vacunas, direccionamiento de anticuerpos monoclonales, estimulación de la respuesta inmune y células citotóxicas naturales (NK). Un problema para este tipo de terapia es que algunas células invasoras permanecen escondidas y comparten características con el tejido normal del cerebro que con el tumor por lo que pueden escapar de

forma eficiente a este tipo de tratamientos. (Laws JR. y Shaffrey 1999, Tatter y Harsh IV 1998)

Terapia génica: alternativa terapéutica para tratamiento de gliomas

La terapia génica es un conjunto de procedimientos en los que material genético es introducido en células somáticas para inducir efectos benéficos al modificar las características genéticas de las células a las que está dirigida, lo cual no es posible conseguir con ninguna otra modalidad terapéutica (Benitez y Segovia 2003, Castro et al. 2003).

El sistema óptimo para transferencia de genes debe ser un vector capaz de llevar insertos de ADN grandes y transducir el tejido blanco de forma eficiente. La expresión del gen terapéutico debe ser estable y con efecto prolongado (según sea al caso) y dirigida selectivamente a células tumorales.

Se han desarrollado diferentes estrategias de terapia, cada una con sus propias limitaciones, por eso lo que se ha buscado es que los productos de los transgenes terapéuticos puedan ser utilizados en combinación, además de complementar las terapias clínicas actuales (Constantini et al. 2000, Castro et al. 2003).

Los vectores empleados para terapia génica se clasifican en dos grupos principales: los no virales y los virales. Dentro de los vectores no virales se encuentran técnicas como la transferencia de ADN desnudo por medio de electroporación y permeabilización de las células entre otros, complejos de ADN con lípidos catiónicos para formar liposomas y los conjugados de poliamina con ADN unidos covalentemente a proteínas específicas reconocidas en la superficie de las células blanco. La desventaja principal del uso de los vectores no virales es la baja eficiencia de transducción y como consecuencia, un bajo nivel de expresión del transgén (Constantini et al. 2000).

El uso de virus como vectores para transferir genes se centra en su habilidad de entrar y mediar la expresión de transgenes en las células transducidas. Los vectores virales más empleados en terapia génica para gliomas han sido retrovirus, adenovirus (Ad), virus adeno-asociados (AAV) y virus de herpes simple (HSV). Actualmente se están desarrollando virus modificados con el fin de buscar diferentes estrategias para evitar su replicación o dirigir la oncólisis en tipos celulares específicos, evitar la transcripción de proteínas tóxicas, así como la respuesta inmunológica, dirigir su tropismo por tipos celulares específicos y aumentar su potencial para empacar la mayor cantidad de bases de genoma externo (Benitez y Segovia 2003, Constantini et al. 2000, Castro et al. 2003).

Diseño de promotores para transgenes con especificidad celular

Como se ha señalado anteriormente, la terapia génica dirigida consiste en obtener la expresión del transgén terapéutico en una población celular específica, protegiendo a todas las demás células de los efectos no deseados del producto del gen.

Una estrategia para obtener selectividad en la expresión de transgenes ha sido el controlar la transcripción a través de promotores o secuencias reguladoras específicas del tipo celular que se desee tratar (Miller y Whelan 1997, Neetlebeck et al. 2000, Segovia et al. 1998, Zamorano et al. 2003) Antes de diseñar un vector que realice esta función, se deben examinar tres puntos importantes: la actividad del promotor, la especificidad del promotor y que la secuencia mínima de ADN para dirigir la expresión génica pueda ser clonada en el vector de expresión (Benitez y Segovia 2003)

En terapia génica para cáncer, se han empleado promotores de tipo específico del tejido, promotores selectivos a tumores, promotores que responden a tratamientos quimioterapéuticos o a radiaciones ionizantes y promotores regulados por el ciclo celular, cada tipo de promotor aprovecha alguna característica específica de la célula tumoral. También se han modificado promotores eliminando las regiones de la secuencia que no contribuyen a la actividad transcripcional o a la especificidad para aumentar la transcripción y reducir la cantidad de ADN en los vectores (Neetlebeck et al. 2000).

Factores de transcripción E2F: su implicación en el ciclo celular y el cáncer.

Una de las características principales de las células cancerosas es su capacidad de proliferar bajo condiciones en las que células normales no lo hacen, esto se debe a un punto de restricción del ciclo celular defectuoso, resultado de aberraciones en los reguladores del ciclo, especialmente los que controlan la transición de G1 a S (Bartek 1997, Sherr 1996)

Como se mencionó anteriormente, la vía de pRB que controla la progresión del ciclo celular se encuentra inactiva en el 80% de los GBMs, el principal mecanismo por el cual pRB funciona como una proteína supresora de tumores se debe a que tiene la capacidad de unirse a factores de transcripción de la familia E2F y regular su actividad a lo largo del ciclo celular (Shan et al. 1996)

En un principio, E2F fue descubierto como una “actividad celular” requerida por la proteína transformadora de la región temprana E1A del Ad para mediar la activación transcripcional del promotor del gen E2 del Ad, ayudando así a la actividad oncogénica (Nevins 1992).

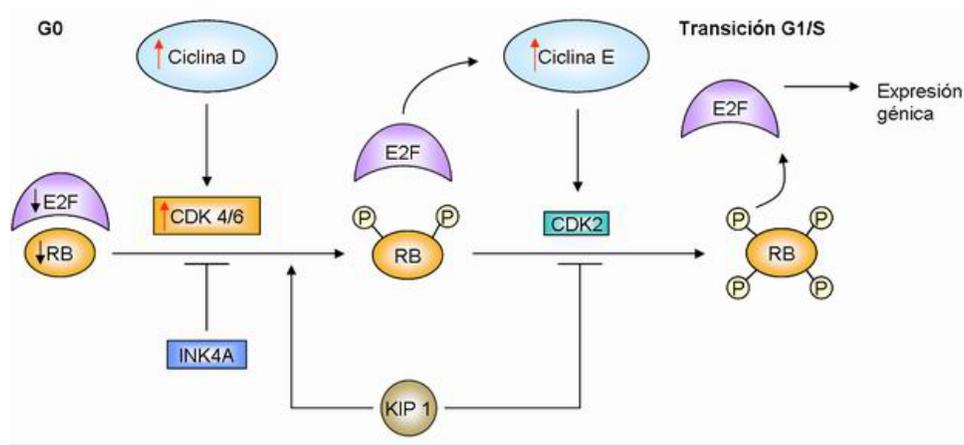
E2F es una familia de proteínas que se une al ADN en la secuencia consenso 5' TTT SS CGC 3' (S= C/G). En la mayoría de las proteínas E2F la región de transactivación en el carboxilo terminal de la proteína se sobrepone con la región de E2F necesaria para unirse a pRB (Farnham et al. 1993, Flemington et al. 1993). Ocho genes se han identificado como componentes de la actividad transcripcional de E2F y se clasifican en dos grupos distintos: los E2Fs (1-6) y los DP (DP1 y DP2) (Trimarchi y Lees 2002).

En experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* se ha observado que la heterodimerización entre E2Fs y DP1 incrementa significativamente la unión al ADN y la transactivación en comparación con E2F o DP1 de forma individual (Helin et al. 1993, DeGregori et al. 1997). Todas las posibles combinaciones de E2F-DP se han descrito *in vivo*, pero no así la función específica de cada uno de estos complejos; por cuestiones prácticas se mencionará a los heterodímeros E2F-DP únicamente como E2F.

Los factores de transcripción E2F se dividen en dos subgrupos: los “E2F activadores” (E2F-1, E2F-2, E2F-3) los cuales, al encontrarse en forma libre, debido a la hiperfosforilación de pRB, pueden transactivar genes especialmente en la salida de G0 y/o la transición de G1 a S (DeGregori et al. 1995b, Ren et al. 2002, He et al. 2000, Takahashi et al. 2000); el segundo subgrupo es conocido como “E2F represores” (E2F-4 E2F-5) los cuales tienen un dominio de transactivación débil y se unen a diferentes proteínas “pocket” (familia de pRB) formando complejos represores que se unen a promotores durante la fase G0, estos promotores son transactivados posteriormente por los E2F activadores durante G1/S (Ren et al. 2002, DeGregori et al. 1997, Trimarchi y Lees 2002, Takahashi et al. 2000)

E2F como activador transcripcional

En G0 se encuentran complejos E2F-pRB que al entrar a fase S del ciclo celular son separados debido a la hiperfosforilación de pRB por complejos de ciclinas-CDKs, permitiendo la acumulación de E2F libre, este cambio se correlaciona con la activación de la transcripción dependiente de E2F (Fig. 5) (Dylnacht et al. 1994, Dyson 1998).



(Zhu y Parada 2002)

Figura 5: E2F en el ciclo celular.

En G0 pRB se encuentra hipofosforilado y se une a E2F. En respuesta a señales de proliferación, pRB es parcialmente fosforilado por complejos de ciclina D-CDK4/6 y completamente por ciclina E-CDK2.

La hiperfosforilación de pRB permite la liberación de los factores de transcripción E2F que activan la expresión de genes requeridos para la transición de G1 a S y a la iniciación de síntesis de ADN. CKIs como INK4a (p16) o KIP1 (p27) regulando negativamente esta vía. Las flechas rojas indican la actividad sobre regulada en tumores y las flechas azules indican pérdida de actividad.

En sistemas *in vitro* de células en fase G0 o G1 obtenidas gracias a la baja concentración de suero, radiaciones γ , o sobreexpresión de CKIs, ha demostrado que la sobreexpresión de E2F-1, E2F-2 y E2F-3 aumenta la transactivación de genes involucrados en la síntesis de ADN y en la regulación de la entrada a fase S del ciclo celular (DeGregori et al. 1995a, Johnson et al. 1993, DeGregori et al. 1997, Wang et al. 1998).

La importancia de E2F libre en el ciclo celular se debe a los genes que estos factores transactivan, ya que están involucrados en procesos esenciales para la progresión del ciclo celular, como por ejemplo la síntesis de ADN (DeGregori et al. 1995a, Ren et al. 2002, Polager et al. 2002, Stanelle et al. 2002 y revisado en Farnham et al. 1993). Los genes que responden a E2F se han clasificado según su función:

- Regulación del ciclo celular: incluye genes como ciclina E, ciclina A, CDK2, E2F-1, E2F-2, E2F-3, pRB, p107.
- Replicación del ADN: transactivación de genes involucrados en el metabolismo de nucleótidos como el gen de timidina cinasa (TK), dihidrofolato reductasa (DHFR); síntesis de ADN como ADN polimerasa α e iniciación de la replicación como ORC1.
- Mitosis: ejemplos de genes que participan en citocinesis (Plk, PRC1)
- Control de puntos de restricción: por ejemplo, la activación de p19ARF

Además, se ha observado que genes asociados a la angiogénesis, como FGF-2 (Factor de crecimiento de fibroblastos) y VEGF-B (factor de crecimiento del endotelio vascular), aumentan su expresión después de la activación mediada por E2F-1 (Ren et al. 2002).

Autorregulación de E2F-1

El factor de transcripción E2F-1 se autorregula positivamente debido a que su promotor cuenta con sitios de unión a E2F activando a sí su propia transcripción, de esta manera contribuye a la acumulación de E2F libre para retroalimentar la transición de G1 a S en el ciclo celular.

El promotor de E2F-1 cuenta con dos secuencias reguladoras palíndromes de unión a E2F. Cuando estas secuencias reguladoras han sido mutadas en otros genes que responden a E2F, como DHFR y TK de ratón, han demostrado ser necesarias para permitir la transcripción de estos genes de forma dependiente del ciclo celular (Neuman et al. 1994, Johnson et al. 1994, Lin et al. 1996, Karlseder et al. 1996). Los experimentos anteriores sugieren la importancia que podrían tener las secuencias reguladoras o sitios de unión a E2F dentro del promotor en la autoregulación de su transcripción.

El promotor de E2F-1 también cuenta con sitios de unión a proteínas Sp1, MBF-1 y NF- κ B, aunque no se conoce con exactitud el significado funcional de esta organización se sabe que diferentes elementos del ADN como los sitios de unión a SP1 son requeridos para la regulación de la transcripción del promotor E2F-1. (Hisao et al. 1994, Lin et al. 1996, Karlseder et al. 1996).

Promotor de E2F-1 en terapia génica.

Ya que en células tumorales se observa un exceso de E2F libre causada por la pérdida de complejos pRB-E2F, la selectividad del promotor E2F-1 a tumores se ha probado en diferentes sistemas debido a la elevada retroalimentación que sufre durante las fases G1 y S del ciclo celular.

Parr y colaboradores en 1997 reportaron la primera prueba de que el promotor de E2F-1 puede dirigir transgenes de forma dependiente del ciclo celular, realizando experimentos en tumores *in vitro* e *in vivo* de una línea celular de glioma de rata llamada "C6". Construyeron vectores adenovirales que contenían el promotor de E2F-1 dirigiendo la expresión de β -galactosidasa y se comparó la actividad del mismo gen dirigido por el promotor de CMV (Citomegalovirus) el cual expresa los genes de forma amplificada pero constitutiva. Los resultados mostraron que la expresión

de β -galactosidasa se encontraba restringida al tumor de células C6 y no en el resto del cerebro como en el caso de β -galactosidasa dirigida por el promotor de CMV.

Además de los experimentos realizados en tumores implantados, demostraron la selectividad del promotor de E2F-1 entre células tumorales y células en regeneración después de una hepatectomía donde no se encontró colocalización entre la actividad de β -galactosidasa y la marca de un antígeno de proliferación nuclear (PCNA). Esta selectividad es atribuida a la pérdida de la vía de pRB en las células tumorales, donde además de la pérdida de complejos pRB-E2F tanto represores como activadores, la actividad de los distintos genes que responden a E2F (esenciales para la proliferación) excede a su actividad en comparación con células normales activamente mitóticas.

Por otro lado, se ha demostrado que la muerte provocada por adenovirus oncolíticos, los cuales tienen la región E1A regulada por el promotor de E2F-1 es selectiva en diferentes líneas de células tumorales y normales; estos resultados coincidieron con que la expresión de E1A fue localizada en líneas celulares tumorales y no en células normales que se encuentran en diferentes fases del ciclo celular (Tsukuda et al. 2002, Jakubezak et al. 2003, Johnson et al. 2002). A pesar de estos resultados, aún no se sabe si el mecanismo por el cual mueren las células es debido a efectos oncolíticos o a una sobreexpresión de E1A que pudiera resultar altamente tóxica, no sólo para las células que lo expresan, sino también para células vecinas.

El objetivo a largo plazo del proyecto es dirigir transgenes con tres diferentes fragmentos del promotor E2F-1 en modelos de gliomas.

En este trabajo de tesis se clonaron tres fragmentos del promotor del factor de transcripción E2F1 en el plásmido pBluescript SK+. El primer fragmento (E2F-Short) cuenta con todas las secuencias reguladoras del promotor hasta antes de la señal de inicio de la transcripción, el segundo fragmento (E2F-Large), incluye todas las secuencias reguladoras del promotor E2F-1 hasta antes del codón de inicio de la traducción y el tercer fragmento (E2F-P) sólo contiene las secuencias reguladoras que reconocen a E2F en el promotor de E2F-1. Estos fragmentos se utilizarán solos o en conjunto con promotores específicos de tejido, valiéndose del control selectivo de las secuencias reguladoras de E2F en la expresión de transgenes de forma dependiente del ciclo celular.

Las ventajas que el promotor de E2F-1 tiene en los modelos de gliomas son:

En el 80% de los GBMs, la vía de pRB se encuentra inactiva y como consecuencia aumenta la proliferación mediada por factores de transcripción de la familia E2F.

En el cerebro, las células no se encuentran en proliferación, por lo que al usar este promotor dirigiendo transgenes puede resultar en una alta selectividad debido a que las únicas células que se encuentran en proliferación y que cuentan con E2F libre son las células tumorales.

La secuencia del promotor es aproximadamente de 360pb, por lo que es fácil de clonar en vectores de expresión debido a su tamaño pequeño.

Objetivos

Objetivo general:

Clonar tres fragmentos de diferente tamaño, del promotor del gen *E2F-1* humano en el vector pBluescript SK +, suficientes para dirigir la transcripción de genes de una forma dependiente del ciclo celular.

Objetivos particulares:

- 1) Obtener los fragmentos E2F-Short y E2F-Large de humano mediante la técnica de PCR de ADN genómico.
- 2) Clonar los fragmentos E2F-Short, E2F-Large y el fragmento sintético E2F-P en el vector pBluescript SK+
- 3) Secuenciar los plásmidos pBlueE2F-Short, pBlueE2F-Large y pBlue E2F-P

Material y métodos

I. Clonación del plásmido pBlueE2F-Short

I.1. Diseño de oligonucleótidos iniciadores E2F-sent5' y E2F-Short3'

I.1.A El diseño de estos oligonucleótidos se llevó a cabo en el programa OLIGO 4.1 y cuentan con las siguientes características:

El oligonucleótido E2F-sent5' fue diseñado para que contuviera un sitio de restricción para la enzima EcoRI en el extremo 5' y su secuencia es:

5' GGA ATT CCC GCC TGG TAC CAT CCG GA 3'.

El oligonucleótido E2F-Short3' se diseñó con un sitio de restricción para la enzima EcoRV y su secuencia es:

5' GAT ATC GCC ACT TTT ACG CGC CAA 3'.

I.1.B Se verificó que los oligonucleótidos diseñados fueran específicos para el promotor de *E2F-1* mediante el programa Blast(N) <http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

I.2 Amplificación del fragmento E2F-Short mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl que contenía 500 ng de ADN humano (donado por la Dra. Elisa Alonso del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez) 1 u de Taq polimerasa (Amersham), 1x de buffer de reacción para PCR (Amersham), 0.5 mM de dNTPs (Invitrogen), 1 pmol de cada primer (E2F-sent5' y E2F-Short 3'), 10 % de dimetil sulfóxido (DMSO) (Merck) y H₂O bidestilada y desionizada. La reacción se llevó a cabo en un termociclador PCR Sprint-Hybaid bajo las siguientes condiciones:

° C	Tiempo	Ciclos
94	3'	1
94	30"	40
60	30"	
72	30"	
72	5'	1
16	8	1

El fragmento amplificado de 237 pb se observó en un gel de agarosa (30 ml) al 2 % preparado con 1 µl de bromuro de etidio (10 mg de bromuro de etidio en 1 ml de H₂O). Se utilizó como referencia un marcador de ADN de 1 kb (Invitrogen).

1.3 Precipitación del ADN

La reacción de PCR fue precipitada empleando: 250 µl de etanol al 100 % y 50 µl de acetato de amonio al 5.2 M pH 7.2 durante 15 min a -20° C; posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm (revoluciones por minuto) durante 15 min, la pastilla se lavó con 200 µl de etanol al 70 % y se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm durante 15 min. La pastilla fue secada a 65° C durante 3 min y resuspendida en 30 µl de H₂O bidestilada y desionizada.

1.4 Reacción de restricción del fragmento E2F-Short con las Enzimas EcoRI y EcoRV

La concentración de ADN fue cuantificada por medio de espectrofotometría con luz ultravioleta (UV) en las longitudes de onda de 260 nm (ADN µg / ml = (cuantificación a 260 nm/0.020* dilución). En un volumen final de 20 µl de reacción se digirieron 5 µg de ADN con 5 u de cada Enzima (EcoRI y EcoRV New England Biolabs), en este caso se empleó el NEB Buffer 3 (New England Biolabs), la restricción se llevó a cabo por una hora a 37° C.

1.5 Restricción del plásmido pBluescript SK+ con las Enzimas EcoRI y EcoRV

Se restringieron 5 µg de plásmido bajo las condiciones indicadas en el punto I.4.

1.6 Purificación del fragmento E2F-Short y del plásmido pBluescript Sk+

Los fragmentos de E2F-Short y pBluescript SK+ fueron separados en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Gibco BRL) al 2 % y al 1 % respectivamente, con 1 µl de bromuro de etidio y posteriormente purificados con el sistema Gene Clean (Bio 101 Inc.) de acuerdo al protocolo del fabricante.

1.7 Ligación del plásmido pBluescript SK+ con el fragmento E2F-Short

La reacción de ligación se llevó a cabo con la enzima T4 ADN ligasa (Gibco BRL) utilizando el protocolo para extremos cohesivos en una relación molar 1:3 (una mol de vector por tres de inserto).

1.8 Transformación de bacterias competentes E.coli DHα5 (Invitrogen) con la reacción de ligación por choque térmico

30 µl de bacterias competentes *E.coli DHα5* junto con 3 µl de reacción de ligación se incubaron en hielo por 30 min, posteriormente se transfirieron a un baño a 42° C por 90 seg, por último se incubaron nuevamente en hielo por 2 min. A las bacterias se les adicionó 1 ml de medio Lennox Broth Base (Invitrogen) y se incubaron en agitación constante a 250 rpm (revoluciones por minuto a 37° C por una hora.

Se sembraron 100 μ l de bacterias transformadas en placas de agar-LB con 50 μ g/ml de Ampicilina (Research Organics), 2 μ l/ml de IPTG 100 mM (Sigma) y 20 μ g/ml de X-gal (Research organics).

I.9 Selección de colonias que contengan pBlueE2F-Short

I.9.A En 2ml de medio LB con 50 mg/ml de Ampicilina se inocularon bacterias de las colonias blancas seleccionadas, se incubaron en agitación constante a 250 rpm a 37° C durante toda la noche.

I.9.B Se obtuvo el ADN plasmídico de las colonias bacterianas seleccionadas mediante ensayos de miniprep siguiendo el protocolo que describen Sambrook y colaboradores en 1989 (apéndice 1).

Para poder observar pequeños fragmentos de ADN (a partir de 50 pb) en los análisis de restricción, los ensayos de miniprep fueron tratados con RNasa A como se describe en el apéndice 2.

I.9.C Análisis de restricción para seleccionar colonias positivas que contuvieran el plásmido pBlueE2F-Short.

Se tomaron 5 μ l del ADN obtenido de ensayos de miniprep y se restringieron con 3 u de la enzima *Avall* (New England Biolabs) durante una hora a 37° C. Los fragmentos de la digestión se observaron mediante un gel de agarosa al 1.5 % con 1 μ l de bromuro de etidio y con marcador de ADN de 1Kb (Invitrogen) como referencia; las colonias que mostraron fragmentos de 1391, 1583 y 222 pb.

Posteriormente se liberó el inserto (223 pb) del ADN plasmídico de las colonias seleccionadas mediante un ensayo de restricción con las Enzimas *EcoRI* y *EcoRV*. Se tomaron 3 μ l del ADN obtenido de ensayos de miniprep y se digirieron con 3 u de cada una de las enzimas durante una hora a 37° C, el ADN de la digestión se observó mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 2 % con 1 μ l de bromuro de etidio y con marcador de ADN de 1Kb (Invitrogen).

I.9.D PCR del fragmento E2F-Short en colonias seleccionadas como positivas.

Se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa del ADN plasmídico de las colonias seleccionadas para obtener el inserto E2F-Short utilizando 1 μ l de ADN plasmídico y siguiendo las condiciones descritas en el punto I.2; los productos de la reacción se visualizaron mediante un gel de agarosa al 2 %.

El producto de PCR se digirió con la Enzima *Avall* (New England Biolabs) para verificar que el producto de PCR fuese E2F-Short, los fragmentos (96 y 141 pb) se observaron en una electroforesis en gel de agarosa al 3 % con 1 μ l de bromuro de etidio y con marcador de ADN de 50 pb (Invitrogen).

I.10 Purificación del plásmido pBlueE2F-Short

El plásmido de una de las colonias seleccionadas fue purificado mediante el sistema QUIAGEN plasmid maxiprep (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

II. Clonación del plásmido pBlueE2F-Large

II.1 Diseño del Oligonucleótido Iniciador E2F-Large3'

II.1.A El diseño del Oligonucleótido E2F-Large3' se llevó a cabo con el programa OLIGO 4.1, se diseñó con un sitio de restricción para la Enzima EcoRV y su secuencia es:

5' GAT ATC TCG GCG AGG GCT CGA TCC 3'.

II.1.B Se verificó que el oligonucleótido E2F-Large fuera específico para el promotor de *e2f-1* utilizando el programa Blast(N) <http://ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

II.2 Amplificación del fragmento E2F-Large mediante la técnica de PCR

La reacción se llevó a cabo empleando los Oligonucleótidos E2F-sent5' (descrito en el punto I.1.A) y E2F-Large3' y bajo las condiciones descritas en el punto I.2.

El fragmento amplificado de 292 pb se observó en un gel de agarosa al 2 % con 1 µl de bromuro de etidio y con marcador de ADN de 1Kb (Invitrogen).

II.3 Precipitación del ADN

El ADN de la reacción de PCR se precipitó como se indica en el paso I.3.

II.4 Reacción de restricción del fragmento E2F-Large con las Enzimas EcoRI y EcoRV

La reacción de restricción con estas enzimas se llevó a cabo para obtener los extremos necesarios para la clonación.

Se digirieron 5 µg del fragmento E2F-Large de acuerdo como se indica en el punto I.4.

II.5 Purificación del fragmento E2F-Large

La digestión del fragmento E2F-Large con las Enzimas EcoRI y EcoRV fue separada por medio de electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 2 % con 1 µl de bromuro de etidio y con marcador de ADN de 1Kb (Invitrogen). El fragmento se purificó utilizando el sistema Gene Clean (Bio 101 Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

II.6 Ligación del plásmido pBluescript SK+ con E2F-Large

La reacción de ligación se llevó a cabo con la enzima T4 ADN ligasa como se indicó en el punto I.7 utilizando pBluescript SK+ previamente purificado (punto I.6).

II.7 Transformación de bacterias competentes E.coli DHα5 (Invitrogen) por choque térmico

El protocolo para la transformación de bacterias competentes fue previamente descrito en el inciso I.8.

II.8 Selección de colonias positivas

II.8.A Los ensayos de miniprep se realizaron conforme a los puntos I.9.A y I.9.B.

II.8.B El análisis de restricción con la Enzima AvaII se realizó como se describe anteriormente en el punto I.9.C; las colonias que se seleccionaron como positivas mostraron fragmentos de, 1436, 1583 y 222 pb en un gel de agarosa al 2 % con 1 µl de bromuro de etidio y con marcador de ADN de 1Kb (Invitrogen). Posteriormente se liberó el inserto de 278 pb con las enzimas EcoRI y EcoRV y se observó en un gel de agarosa al 2 % previamente descrito.

II.8.C Se llevó a cabo una reacción de PCR para obtener el inserto E2F-Large empleando 1 µl de ADN plasmídico y conforme a las condiciones descritas en el paso II.2. El producto de PCR se digirió con la Enzima AvaII para verificar que fuese E2F-Large, los fragmentos de 196 y 96 pb se observaron en un gel de agarosa al 3% con 1 µl de bromuro de etidio y con marcador de ADN de 50 pb (Invitrogen).

II.9 Purificación del plásmido pBlueE2F-Large.

El plásmido de una de las colonias seleccionadas se purificó mediante el sistema QUIAGEN plasmid maxiprep (Quiagen) siguiendo el protocolo del fabricante.

III. Clonación del plásmido pBlueE2F-P

III.1 Restricción de E2F-P con las enzimas NotI y HindIII

El ADN sintético de doble cadena E2F-P (sintetizado por la compañía Bio-synthesis) fue diseñado con dos sitios de restricción, para NotI en el extremo 5' y para HindIII en el extremo 3'. La secuencia del oligonucleótido es la siguiente: 5' ATA AGA ATG CGG CCG CTA AAC TAT TTT CGC GGC AAA AAG GAT TTG GCG CGT AAA CCC AAG CTT.3'. La restricción con las enzimas se realizó para obtener los sitios necesarios para la clonación; en un volumen final de 20 µl se digirieron 5 µg de E2F-P con 5 u de NotI y HindIII (New England Biolabs)

respectivamente, se utilizó el NEB Buffer 2 (New England Biolabs) 1x para poder realizar la doble restricción.

III.2 Purificación de E2F-P

El fragmento de restricción se purificó mediante el sistema MER Maid Spin (Bio 101 Inc.) para ADN de 10 a 100 pb siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.3 Restricción de pBluescript SK+

La restricción de pBluescript se llevó a cabo con las Enzimas NotI y HindIII como se describe en el punto III.1.

III.4 Purificación de pBluescript SK+ digerido con NotI y HindIII

Los fragmentos de restricción fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1 % con 1 µl de bromuro de etidio y con marcador de ADN de 1Kb (Invitrogen) y posteriormente se purificó utilizando el sistema Gene Clean (Bio 101 Inc.).

III.5 Ligación de pBluescript SK+ y E2F-P

Esta reacción se llevó a cabo utilizando la Enzima T4 ADN ligasa y siguiendo el protocolo como se indica en el inciso I.7.

III.6 Transformación de bacterias competentes E.coli DHa5 (Invitrogen)

El protocolo para la transformación de las bacterias con la reacción de ligación de pBluescript SK+ y E2F-P se realizó mediante choque térmico como se describió en el punto I.8.

III.7 Selección de colonias positivas

La selección de colonias positivas se llevó a cabo conforme a los pasos I.9.A y I.9.B.

III.8 Análisis de restricción para seleccionar colonias positivas.

La reacción de restricción del ADN plasmídico de las colonias se llevó a cabo con la Enzima EcoRV. Se tomaron 5 µl de ADN de ensayos de minipreps y se restringieron con 3 u de Enzima EcoRV (New England Biolabs), 1x de BSA, NEB Buffer 3 al 1x (New England Biolabs) a 37° C en un volumen final de 20 µl. En una electroforesis con gel de agarosa al 1.5 % con 1 µl de bromuro de etidio (10 mg de bromuro de etidio se observaron las reacciones; los plásmidos no digeridos con la enzima fueron seleccionados como positivos.

III.9 Purificación del plásmido pBlueE2F-P

Una colonia seleccionada como positiva fue purificada por medio de QUIAGEN plasmid maxiprep (Quiagen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

IV Secuenciación de los plásmidos pBlueE2F

IV.1 La secuenciación se llevó a cabo con el Secuenciador: Modelo 3100 Genetic analyzer del laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM.

IV.2 Se utilizaron los Primers T7 y Reverso para pBluescript en la reacción de secuenciación con el sistema ABI Prism BigDye Terminator V2.0.

I.V.3 El análisis de las secuencias se llevó a cabo con el programa MegaAlign empleando un método por grupos de pares de bases (clustal method).

Resultados

Amplificación de los fragmentos E2F-Short y E2F-Large mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los fragmentos de E2F-Short y E2F-Large de 237 y 292pb respectivamente, fueron amplificados a partir de ADN humano, bajo las mismas condiciones de reacción y con oligos diseñados específicamente para el promotor de E2F-1. (Fig. 6).

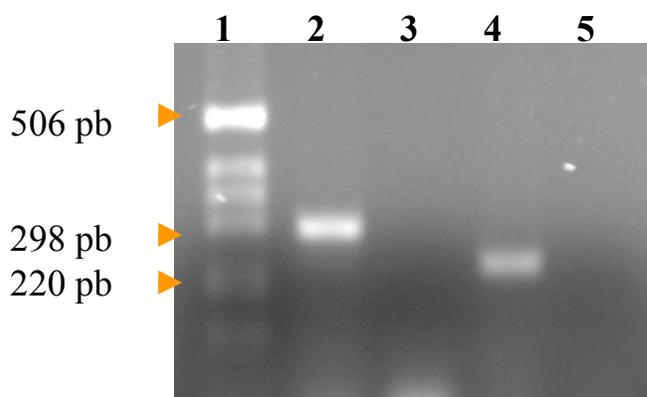


Figura 6: Reacción de PCR donde se muestran los fragmentos del promotor de E2F-1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. En el carril 1 se muestra el marcador de 1Kb; en los carriles 2 y 3 se muestra el fragmento de E2F-Large de 292pb y su control negativo (reacción de PCR sin ADN) respectivamente. En los carriles 4 y 5 se muestra el fragmento E2F-Short de 237pb y su control negativo respectivamente.

Clonación del fragmento E2F-Short en el plásmido pBluescript SK+.

Los oligos utilizados para la reacción de PCR del fragmento E2F-Short cuentan con sitios de restricción con el fin de que el fragmento E2F-Short pueda ser digerido por la enzima EcoRI en el extremo 5' y por la enzima EcoRV en el extremo 3'. El plásmido pBluescript SK+ también fue digerido con las enzimas EcoRI y EcoRV con el propósito de realizar una clonación dirigida (Fig. 7).

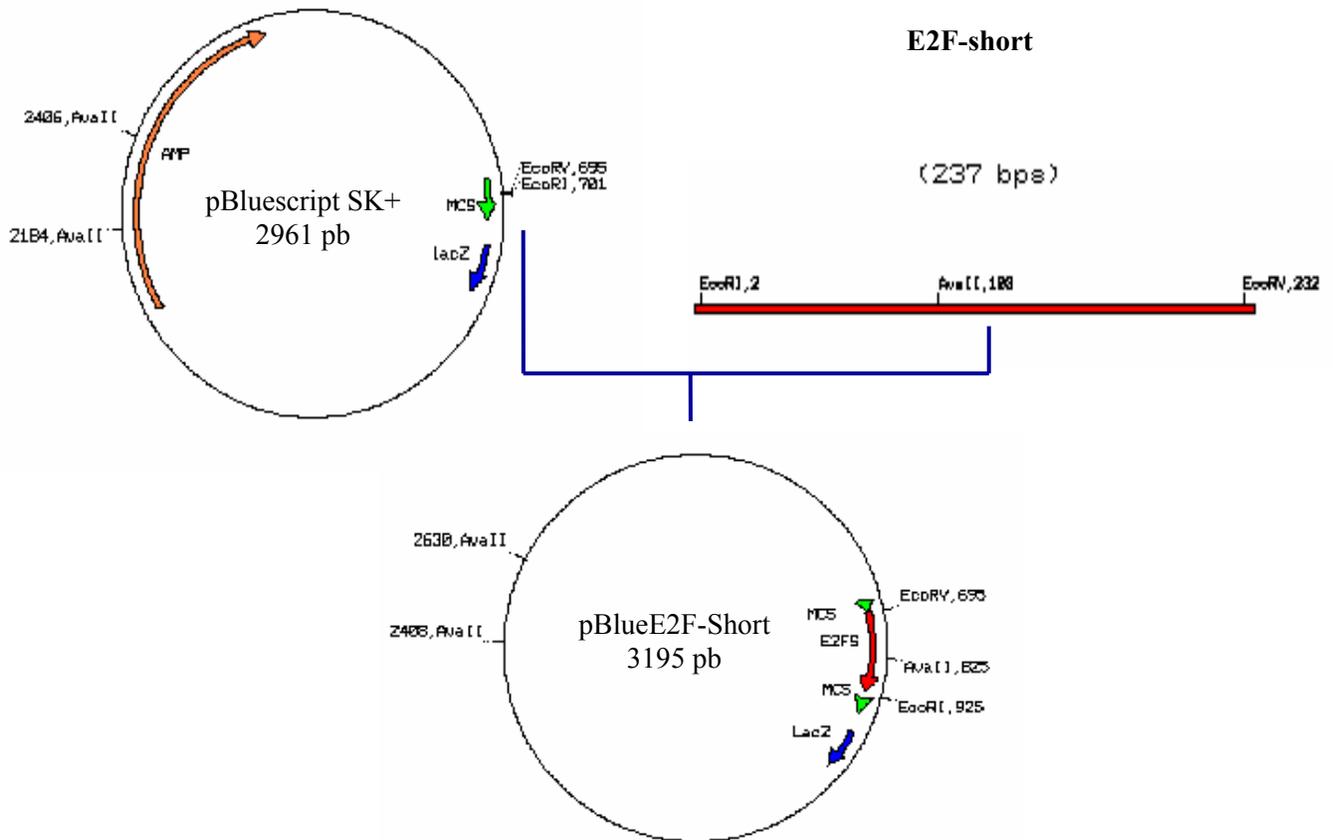


Figura 7: Estrategia de clonación para el plásmido pBlueE2F-Short

En el lado izquierdo se muestra un mapa del plásmido pBluescript SK+ donde están señalados los sitios de restricción para las enzimas EcoRI, EcoRV y AvaII. Del lado derecho se muestra un esquema del fragmento E2F-Short con los sitios de restricción para las mismas enzimas. En la parte inferior se muestra el mapa circular de la clonación del plásmido pBlueE2F-Short.

Después de la reacción de ligación, se buscó que el inserto E2F-Short se encontrara en el plásmido liberando el fragmento de 230 pb con las enzimas EcoRI y EcoRV. Por otro lado, se llevó a cabo un análisis de restricción con la enzima AvaII debido a que el fragmento E2F-short cuenta con un sitio de restricción para esta enzima; al digerir el plásmido pBlueE2F-Short con la enzima AvaII se generan tres fragmentos de 222, 1583 y 1391 pb respectivamente, en comparación con pBluescript SK+ que genera dos fragmentos de 222 y 2739pb (Fig.8).

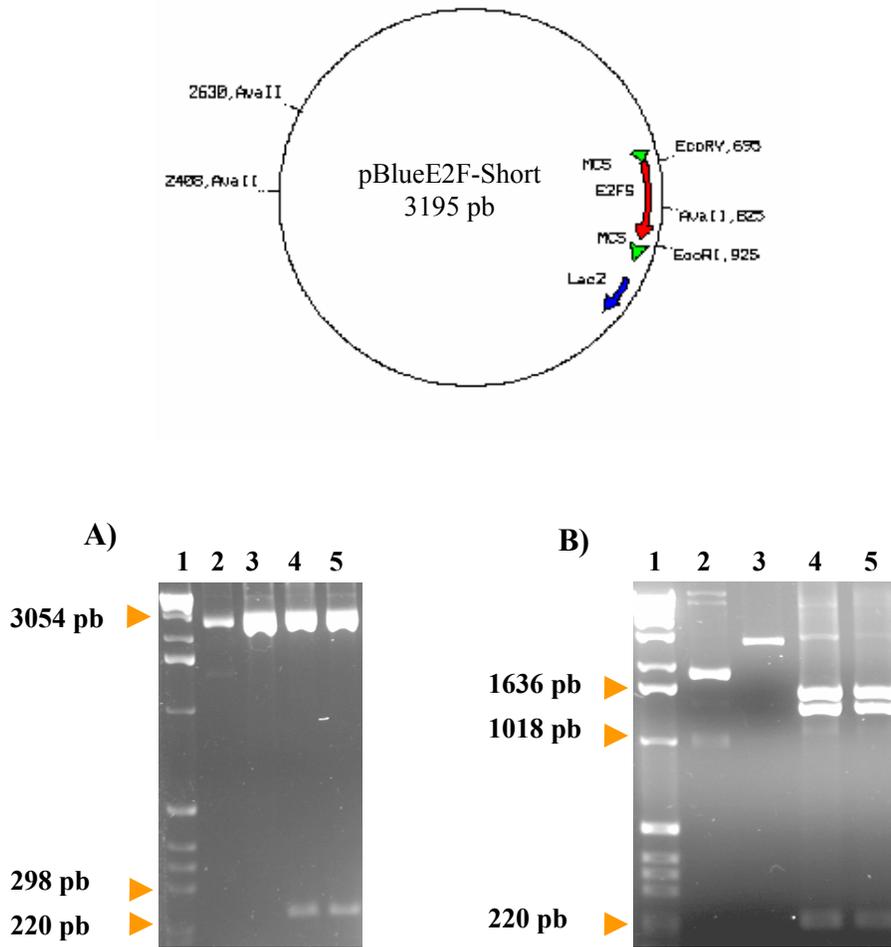


Figura 8: Clonación del plásmido pBlueE2F-Short.

En la parte superior de la figura, se muestra el esquema del plásmido pBlueE2F-Short donde se indican los sitios de restricción para las enzimas EcoRI, EcoRV y AvaII. En **A)** se muestra una electroforesis en gel de agarosa al 2% (teñido con bromuro de etidio) con plásmidos pBlueE2FShort digeridos con las enzimas EcoRI y EcoRV para liberar el fragmento E2F-Short de 230 pb; el marcador de 1Kb se encuentra en el carril 1, pBluescript SK+ sin digerir en el carril 2, pBluescript digerido en el carril 3, en los carriles 4 y 5 se muestran plásmidos pBlueE2F-Short que liberaron un fragmento de 223 pb digeridos con las enzimas EcoRI y EcoRV. En **B)** se muestra una electroforesis en gel de agarosa al 2% de los mismos plásmidos digeridos con la enzima AvaII. En el carril 1 se muestra el marcador de 1Kb, en los carriles 2 y 3 pBluescript SK+ sin restringir y restringido respectivamente, en los carriles 4 y 5 se muestran plásmidos pBlueE2F-Short restringidos donde se generan fragmentos de 1603, 1380 y 222 pb.

En la figura 9 se muestra una electroforesis de una reacción de PCR para verificar que el inserto puede ser amplificado. Este producto de PCR

también fue digerido con la enzima *Ava*II que genera fragmentos de 136 y 96pb.

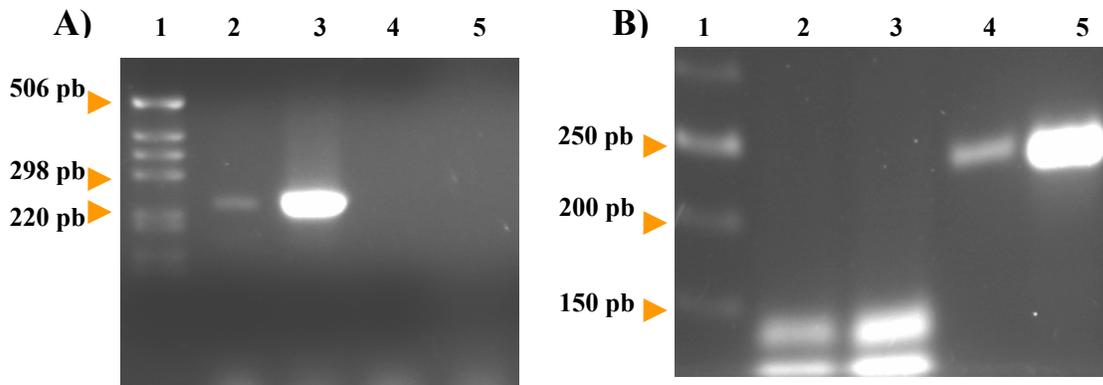


Figura 9: Amplificación de E2F-Short del plásmido pBlueE2FShort.

En **A)** se muestra una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, donde se observa el producto de la reacción de PCR para el fragmento E2F-Short del plásmido pBlueE2F-Short. En el carril 1 se muestra el marcador de 1 Kb, en el carril 2 un fragmento E2F-Short de ADN humano, en el carril 3 se muestra la amplificación de un fragmento E2F-Short de 237 pb del plásmido pBlueE2F-Short, en el carril 4 se muestra el control negativo de la reacción (reacción de PCR sin ADN) y en el carril 5 la reacción con el plásmido pBluescript SK+ como un segundo control negativo (nos se amplifica el fragmento pues los oligonucleótidos de la reacción no hibridan con pBluescript).

En **B)** se muestra una electroforesis en gel de agarosa al 3% con los productos de PCR digeridos con *Ava*II. El marcador de 50 pb se encuentra en el carril 1, en los carriles 2 y 3 se observan las digestiones de los productos de PCR con ADN humano y con pBlueE2F-Short respectivamente; en esta digestión se generan fragmentos de 136 y 101 pb. En los carriles 4 y 5 se muestran los productos de PCR sin digerir de ADN humano y de pBlueE2F-Short respectivamente.

El plásmido pBlueE2F-Short fue secuenciado para verificar la homología con el promotor de E2F-1. En la figura 10 se muestra una parte del electroferograma de la secuenciación donde se localiza el fragmento E2F-Short. La figura 11 muestra un análisis de la secuencia realizada con el programa MegAlign del fragmento E2F-Short contra la secuencia del promotor de E2F-1 reportada por Neuman y colaboradores en 1994; en esta figura se puede observar que existen diferencias en relación con la secuencia reportada, en las bases 50 (T en lugar de C) y 93 (C en lugar de T) del producto de PCR.

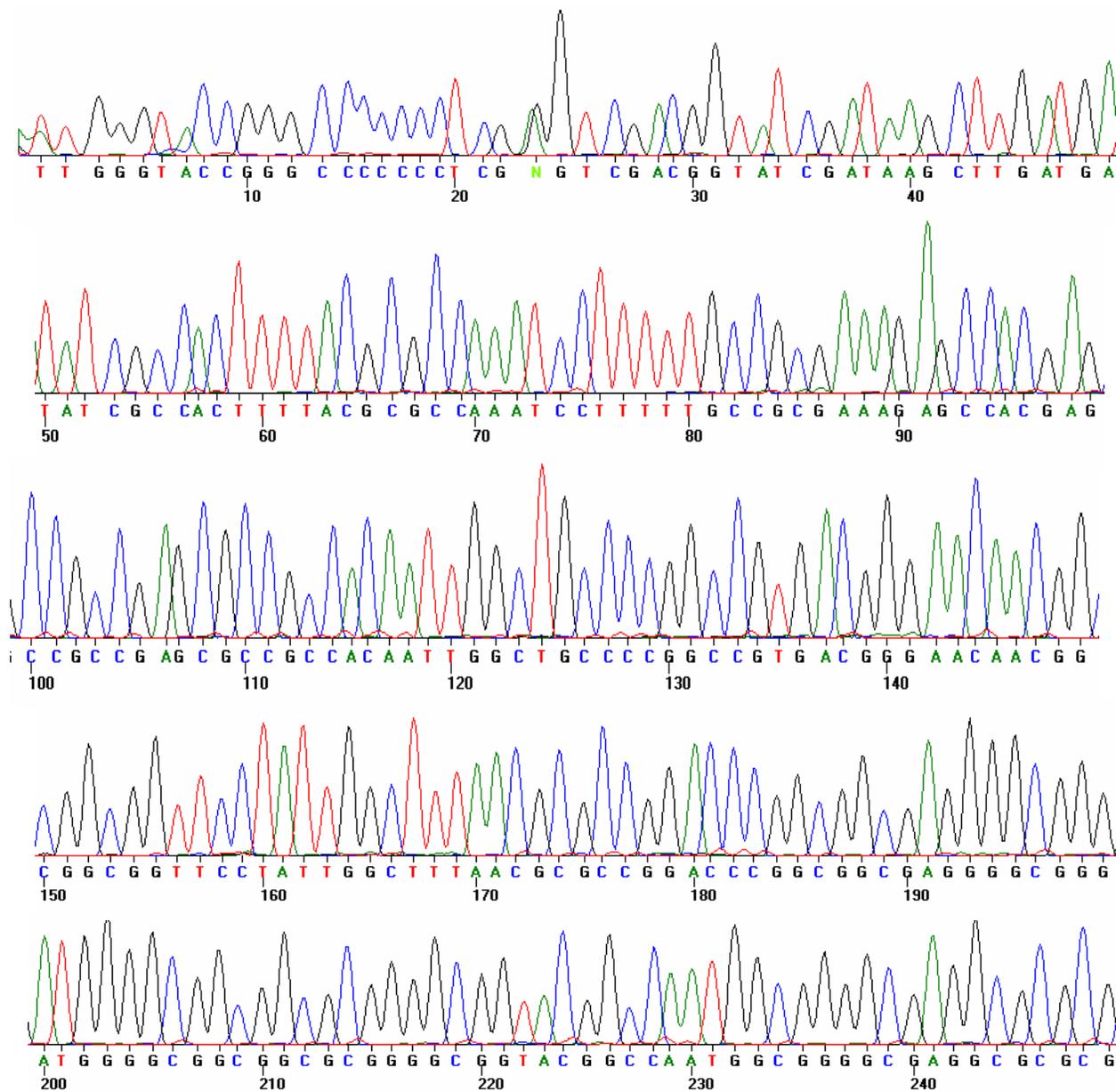


Figura 10: Electroferograma de la parte que corresponde al fragmento de E2F-Short de la secuenciación del plásmido pBlueE2F-Short.

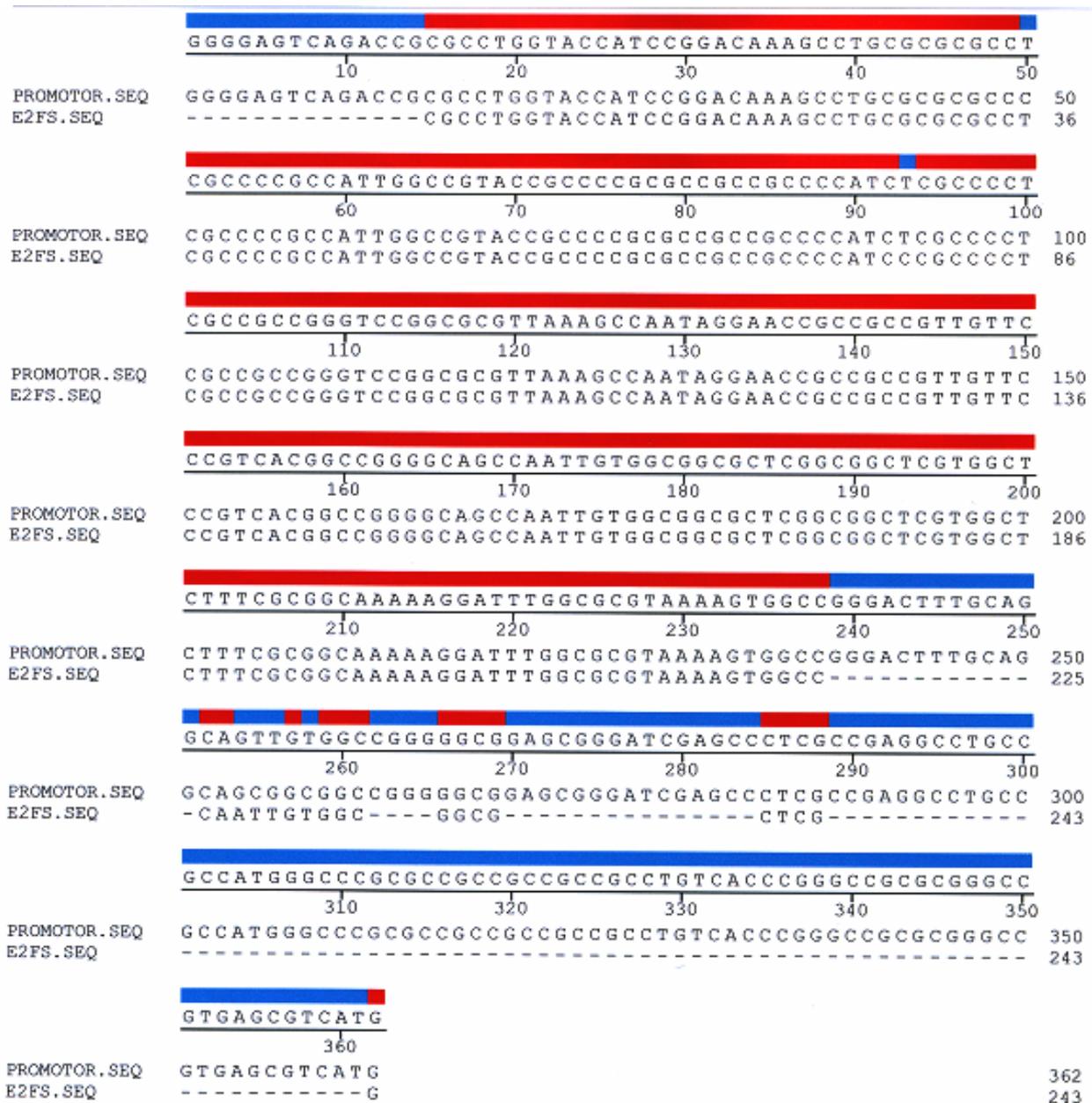


Figura 11: Análisis de la secuenciación de E2F-Short.

Alineamiento entre la secuencia del promotor de E2F-1 (secuencia superior, PROMOTOR.SEQ) y los resultados de la secuenciación del fragmento de E2F-Short del plásmido pBlueE2FShort (secuencia inferior, E2F-S.SEQ), el fragmento E2F-Short se encuentra de la base 15 a la base 239 del promotor de E2F-1. En rojo se muestran las bases que entre las dos secuencias coinciden completamente, en azul se muestran las bases que tienen una similitud menor.

Clonación del fragmento E2F-Large en el plásmido pBluescript SK +

En la figura 12 se muestra la estrategia de clonación del plásmido pBlueE2F-Large la cual, es muy similar a la del plásmido pBlueE2F-Short debido a que el fragmento E2F-Large, amplificado por PCR, fue también diseñado con los sitios de restricción para la enzima EcoRI en el extremo 5' y EcoRV en el extremo 3'. Al digerir los extremos del fragmento E2F-Large con las enzimas antes mencionadas se generan extremos para ligar el fragmento dentro del plásmido pBluescript SK+ previamente digerido con las mismas enzimas.

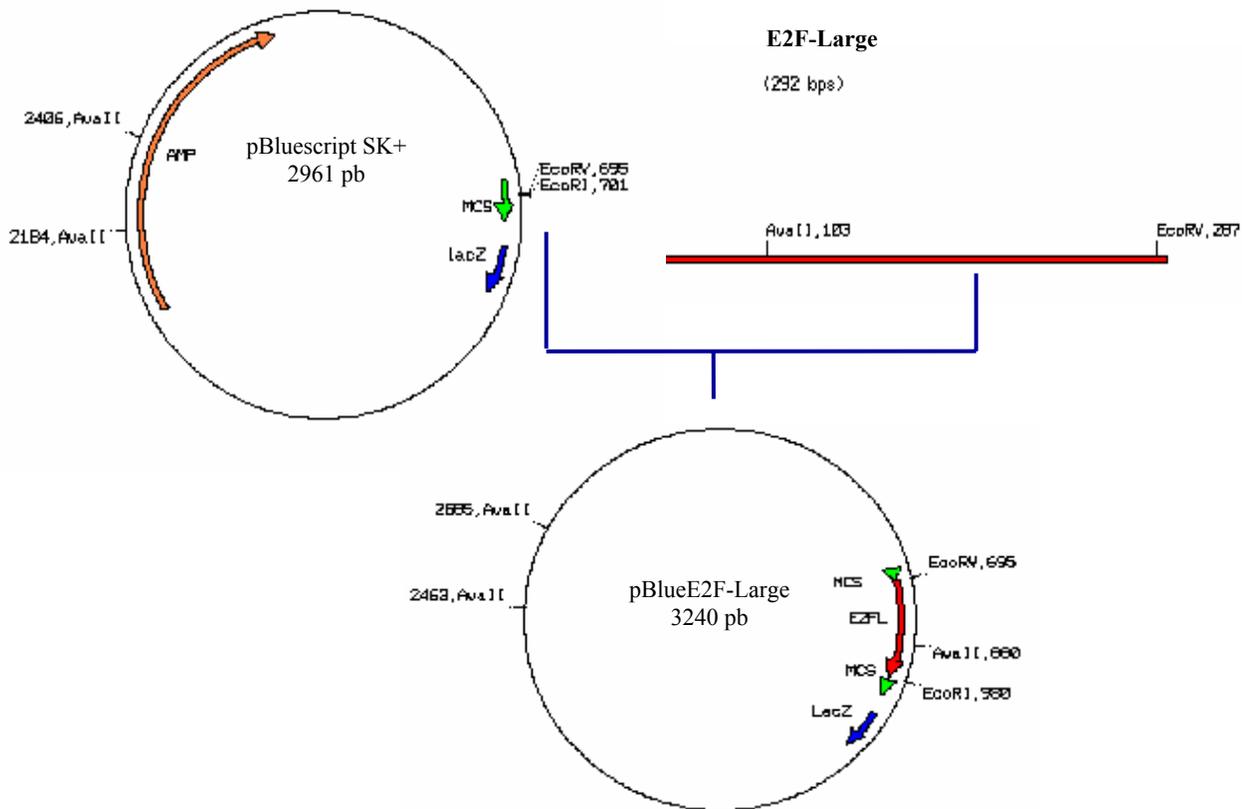


Figura 12: Estrategia de clonación para el plásmido pBlueE2F-Large.

En el lado izquierdo se muestra un mapa circular del plásmido pBluescript SK+ donde están señalados los sitios de restricción para las enzimas EcoRI, EcoRV y AvaII. En el lado derecho, se muestra un esquema del fragmento E2F-Large con los sitios de restricción para las mismas enzimas. En la parte inferior se muestra el mapa circular de la clonación del fragmento E2F-Large en el plásmido pBluescript SK+.

Después de la reacción de ligación, se buscó que el inserto E2F-Large hubiese sido clonado en el plásmido, liberando el fragmento de 285pb por medio de la restricción con las enzimas EcoRI y EcoRV. Por otra parte, se llevó a cabo una análisis de restricción con la enzima AvaII, la cual genera

tres fragmentos de 222, 1583 y 1436 pb en el plásmido pBlueE2F-Large y dos fragmentos, uno de 2739 y otro de 222 pb en el plásmido pBluescript SK+ (Fig. 13).

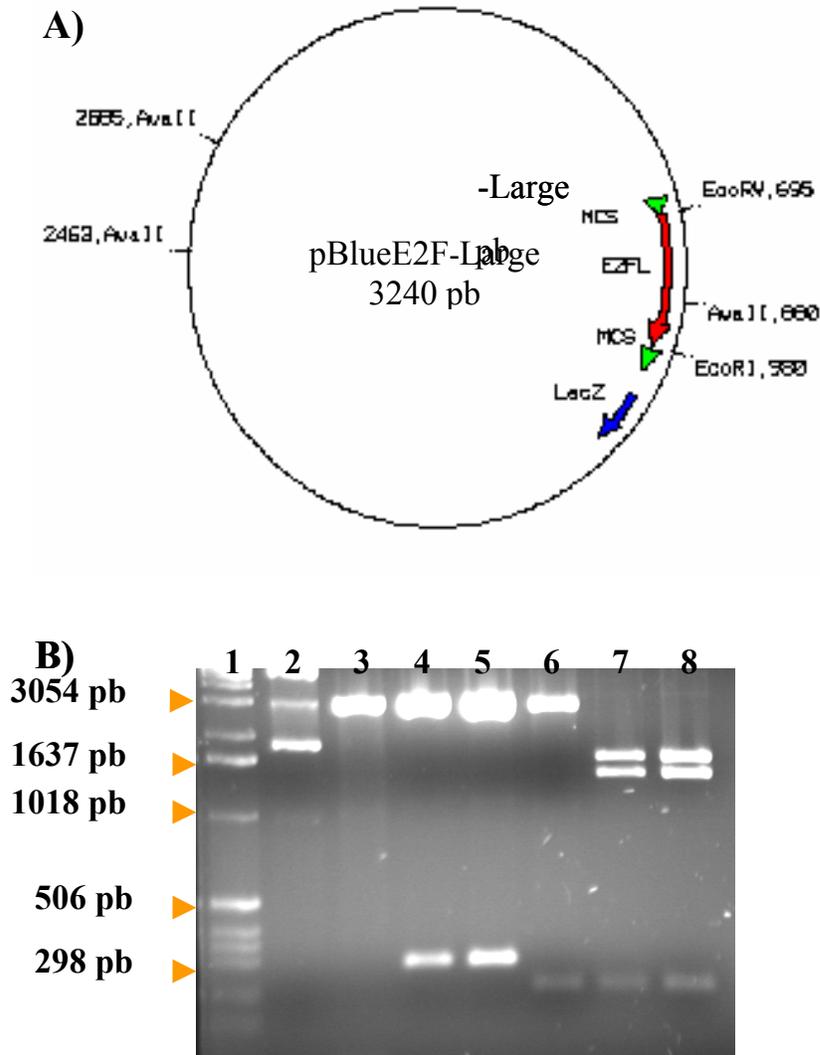


Figura 13: Clonación del plásmido pBlueE2F-Large.

A) Esquema del plásmido pBlueE2F-Large donde se indican los sitios de restricción para las enzimas EcoRI, EcoRV y AvaII. **B)** electroforesis en gel de agarosa al 2% (teñido con bromuro de etidio) con el plásmido pBlueE2F-Large digerido con las enzimas EcoRI y EcoRV y AvaII. En el carril 1 se muestra el marcador de ADN de 1 Kb, en el carril 2 se muestra el plásmido pBluescript sin digerir; carril 3, pBluescript restringido con EcoRI y EcoRV, carriles 4 y 5 presentan plásmidos digeridos con EcoRI y EcoRV que liberan un fragmento de 285 pb. El plásmido pBluescript digerido con AvaII se muestra en el carril 6, los carriles 7 y 8 muestran los mismos plásmidos que 4 y 5 pero digeridos con AvaII donde se generan fragmentos de 222, 1583 y 1436 pb.

En la figura 14 se muestra una reacción de PCR en la cual se amplificó el fragmento E2F-Large del plásmido pBlueE2F-Large. El producto de PCR también fue digerido con la enzima *Ava*II.

Los resultados de la secuenciación se muestran en las figuras 15 y 16. En la figura 15 se muestra una parte del electroferograma de la secuenciación que corresponde al fragmento E2F-Large, la figura 16 muestra un alineamiento entre la secuencia del promotor de E2F-1 y el resultado de la secuenciación del plásmido pBlueE2F-Large; en esta figura se pueden observar diferencias entre la secuencia original y el producto de PCR, en las bases 15 y 16 (corresponden al oligonucleótido E2F-sent 5') y la base 50 (una T por una C) y 93 (una C en lugar de T).

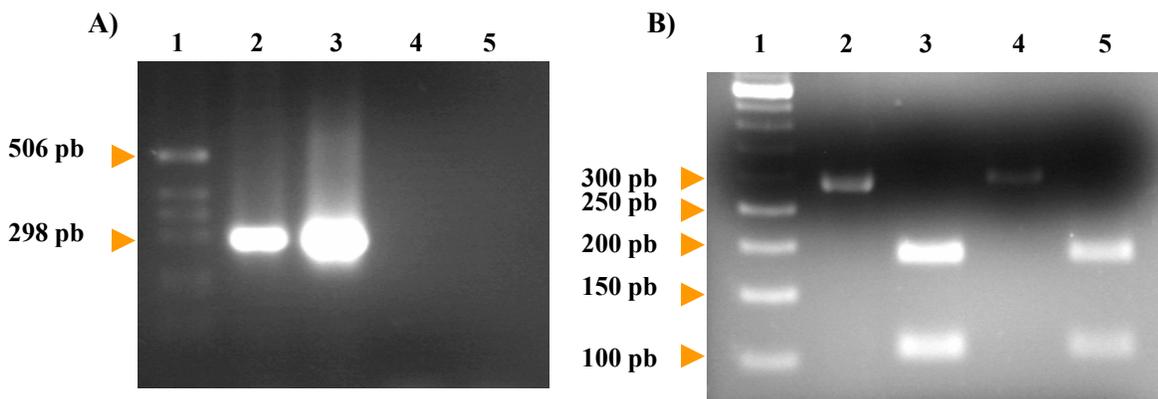


Figura 14: Amplificación de E2F-Large del plásmido pBlueE2F-Large

A) Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio donde se muestra la reacción de PCR para el fragmento E2F-Large del plásmido pBlueE2F-Large. En el carril 1 se muestra el marcador de 1 Kb, en el carril 2 se observa la reacción de PCR con ADN humano, en el carril 3 se observa un fragmento de 292 pb amplificado del plásmido pBlueE2F-Large, en el carril 4 se muestra el control negativo de la reacción (reacción de PCR sin ADN) y en el carril 5 la reacción con el plásmido pBluescript SK+ como segundo control negativo (los oligonucleótidos no hibridan con pBluescript).

B) Electroforesis en gel de agarosa al 3% donde se muestra el producto de la reacción de PCR digerido con la enzima *Ava*II. En el carril 1 se encuentra el marcador de 50 pb, en los carriles 2 y 3 se observa el producto de la reacción de PCR de ADN humano sin digerir y digerido respectivamente, en el carril 4 se muestra el producto de la reacción de PCR con el plásmido pBlueE2F-Large sin digerir y en el carril 5 se muestra el mismo producto digerido con la enzima *Ava*II.

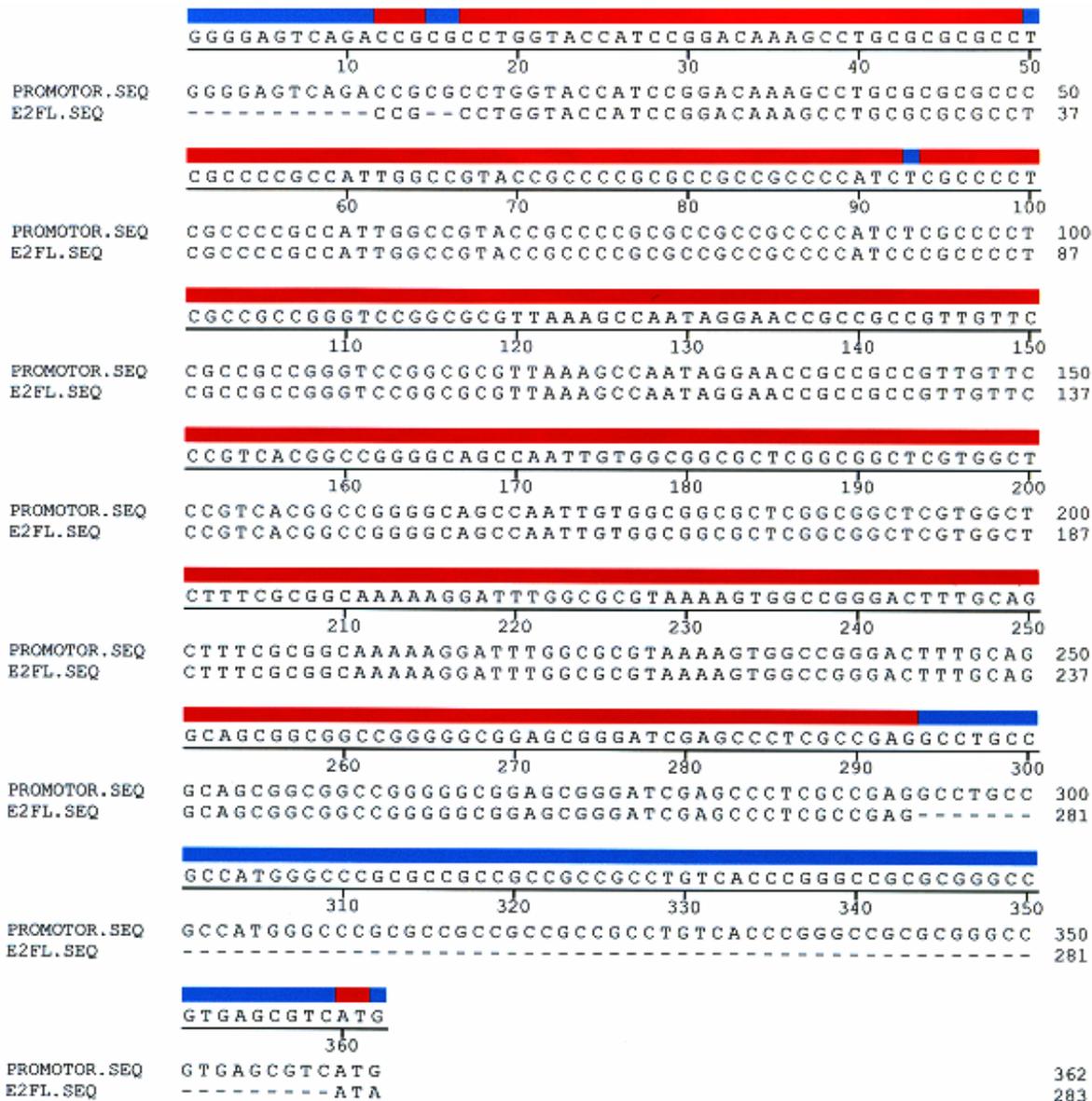


Figura 16: Análisis de la secuenciación de E2F-Large.

En rojo se muestran las bases que coinciden completamente entre las dos secuencias, en azul se muestran las bases que tienen una similitud menor. La secuencia que se encuentra en primer lugar (PROMOTOR.SEQ) corresponde a la del promotor de E2F-1. La secuencia inferior (E2F-L.SEQ) corresponde al resultado de la secuenciación del fragmento E2F-Large del plásmido pBlueE2F-Large que se encuentra de la base 15 a la base 293 del promotor de E2F-1.

Clonación del fragmento E2F-P en el plásmido pBluescript SK+

El ADN sintético de doble cadena E2F-P cuenta con dos sitios de restricción, para las enzimas NotI en el extremo 5' y para HindIII en el extremo 3'; el plásmido pBluescript SK+ también cuenta con sitios de restricción para estas enzimas por lo que, tanto el fragmento E2F-P como el plásmido pBluescript SK+ fueron digeridos con las enzimas NotI y HindIII para facilitar la clonación (Fig. 17)

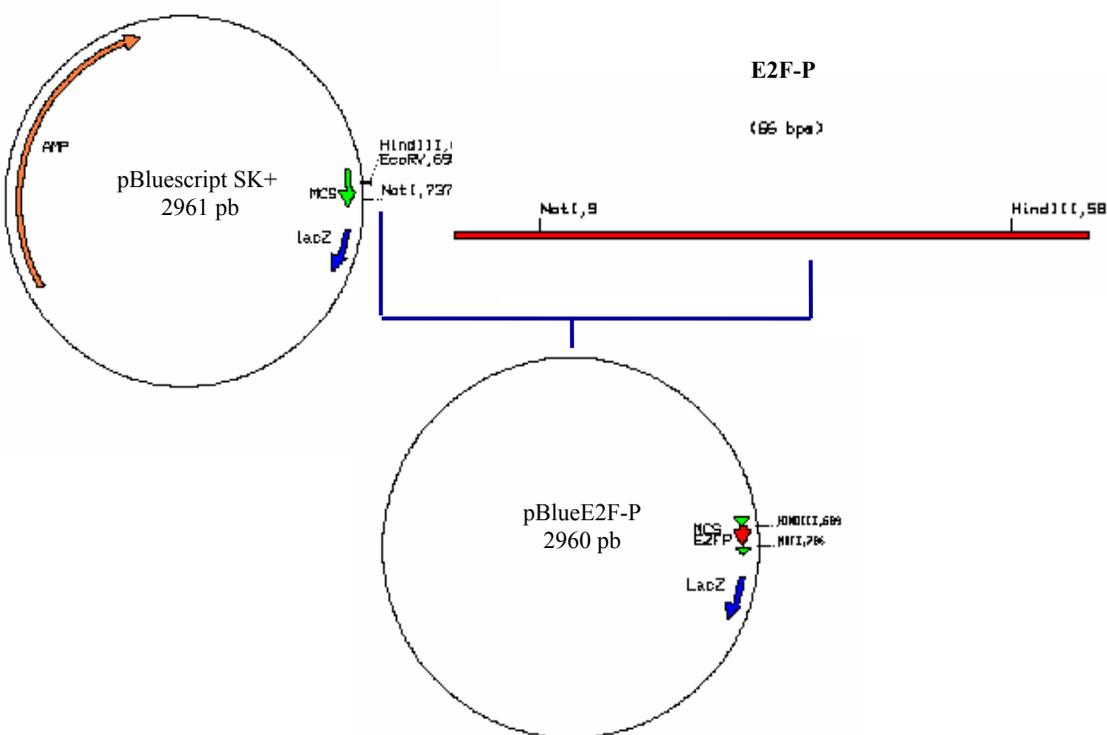


Figura 17: Estrategia de clonación del ADN sintético E2F-P.

En el lado izquierdo se muestra un mapa del plásmido pBluescript SK+ donde están señalados los sitios de restricción para las enzimas NotI, HindIII y EcoRV. En el lado derecho se muestra un esquema del fragmento E2F-P con los sitios de restricción para las enzimas NotI y HindIII. En la parte inferior se encuentra el mapa del plásmido pBlueE2F-P en el que se señalan los sitios de restricción para las enzimas NotI y HindIII.

Debido a que el fragmento E2F-P a clonar es de 47 pb y, que el fragmento que se libera del plásmido pBluescript SK+ con las enzimas NotI y HindIII

es de una longitud muy similar (49 pb), la única diferencia para seleccionar el plásmido que tuviera el fragmento E2F-P era digerirlo con la enzima EcoRV debido a que este sitio de restricción se pierde en pBlueE2F-P durante la estrategia de clonación. Al digerir con la enzima EcoRV el plásmido pBluescript SK+ se lineariza y en el plásmido pBlueE2F-P no ocurre la digestión (Fig. 18).

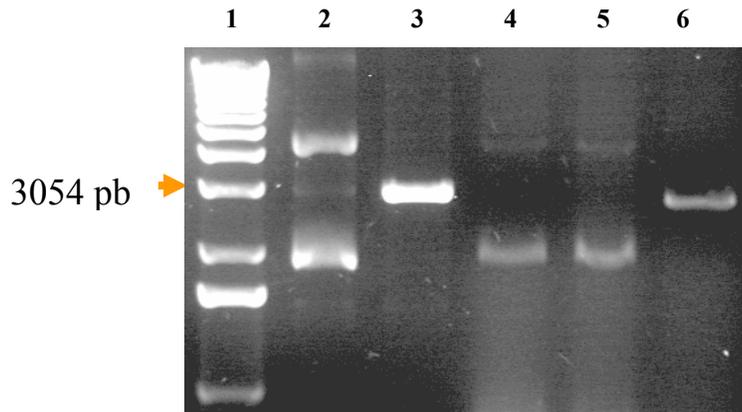


Figura 18: Selección del plásmido pBlueE2F-P.

Para seleccionar el plásmido pBlueE2F-P se comparó la digestión de la enzima EcoRV en el plásmido pBluescript SK+ con el plásmido pBlueE2F-P. En esta electroforesis en gel de agarosa al 2% (teñido con bromuro de etidio) se observan las diferencias entre plásmidos con o sin el inserto E2F-P. En el carril 1 se muestra el marcador de 1 Kb., en el carril 2 se observa el plásmido pBluescript SK+ sin digerir, en el carril 3 se encuentra el plásmido pBluescript SK+ digerido con EcoRV que se lineariza (2961 pb) como control negativo, en los carriles 4 y 5 se observan plásmidos con el inserto E2F-P que no pudieron ser digeridos por la enzima EcoRV y en el carril 6 se muestra un plásmido sin inserto que fue digerido por la misma enzima.

El plásmido seleccionado como pBlueE2F-P fue secuenciado para confirmar que realmente contuviera el inserto E2F-P. El electroferograma de la reacción de secuenciación se muestra en la figura 19 y en la figura 20 se muestra el alineamiento entre la secuencia del promotor de E2F-1, la secuencia de E2F-P y la del resultado de la secuenciación del plásmido pBlueE2F-P.

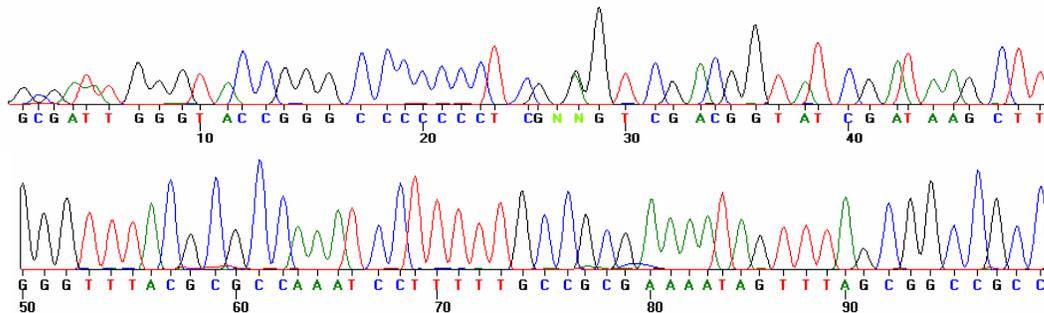


Figura 19: Electroferograma de la parte que corresponde a la secuenciación del fragmento E2F-P del plásmido pBlueE2F-P.

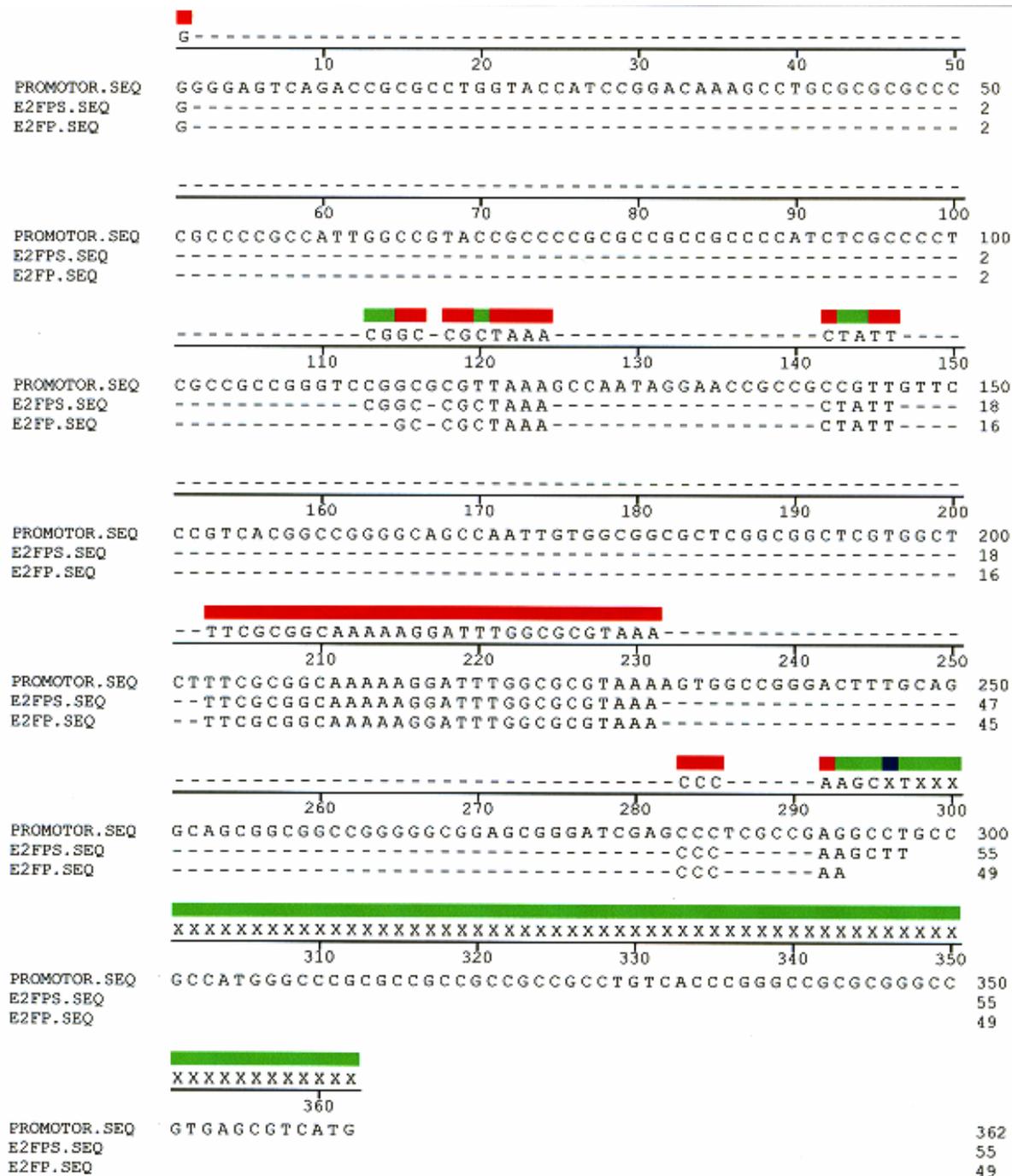


Figura 20: Análisis de la secuenciación del plásmido pBlueE2F-P.

En la primera línea (PROMOTOR.SEQ) se observa la secuencia del promotor de E2F-1 la cual es comparada con la secuencia de E2F-P (segunda línea, E2F-PS.SEQ) y el resultado de la secuenciación del plásmido pBlueE2F-P que corresponde a la tercera línea (E2F-P.SEQ). En rojo se encuentra señalada la secuencia que coincide completamente entre las tres, la cual corresponde a los sitios de unión a E2F que se encuentran de la base 203 a la base 231 del promotor de E2F-1. En azul y verde se muestran las regiones que coinciden en menor grado entre las tres secuencias.

Discusión

El glioblastoma multiforme es el tumor cerebral más frecuente y de mayor malignidad ya que posee un alto índice de proliferación y migración extensiva, lo que les permite infiltrarse en el tejido circundante (Pietsch y Wiestler 1997).

El rango de supervivencia de los pacientes después del diagnóstico para GBM varía entre los nueve y doce meses. El tratamiento actual para estos tumores es principalmente la resección quirúrgica la cual se lleva a cabo en conjunto con radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, la recurrencia de este tumor es muy común, la cual aparece entre los seis y doce meses para GBM y entre dieciocho a treinta y seis meses en astrocitomas anaplásicos (WHO grado II) (Castro et al. 2003).

La terapia génica como alternativa terapéutica tiene como objetivo desarrollar tratamientos que dirijan la actividad de genes terapéuticos específicamente a los tejidos o a las células afectadas por la enfermedad. Una de las estrategias para conseguir la especificidad en la expresión de transgenes en tumores, es a través de promotores o de elementos reguladores de genes que están sobreexpresados en las células malignas, lo anterior brinda un control en la transcripción de transgenes que restringe la expresión de genes suicidas o terapéuticos a éstas células (Miller y Whelan 1997).

El uso del promotor del factor de transcripción E2F-1 ha demostrado ser una estrategia efectiva para dirigir la expresión de transgenes en células tumorales gracias a que este promotor cuenta con sitios de unión a factores de transcripción E2F que lo autorregulan de forma positiva. En las células de gliomas, esta autorregulación, acompañada con la pérdida de la vía de pRB, da como resultado una elevada expresión de factores de transcripción E2F así como de genes involucrados en la proliferación llevando a las células a un crecimiento descontrolado signo de malignidad en las células tumorales (Tsukuda et al. 2002, Jakubezak et al. 2003).

En 1997 Parr y colaboradores utilizaron por primera vez este promotor para dirigir la expresión de los genes de β -galactosidasa (β -gal) y de la timidina cinasa (TK) de HSV de forma dependiente del ciclo celular en células de glioma de rata C6 tanto *in vitro* como *in vivo*. Los resultados más sobresalientes de estos experimentos fueron, en primer lugar, la expresión de la β -galactosidasa específicamente en el área del tumor en gliomas implantados y en segundo lugar, la ausencia de β -galactosidasa en células marcadas con el antígeno de proliferación nuclear (PCNA) en

hígado de rata después de una hepatectomía parcial, lo que sugiere una selectividad entre células tumorales y normales en proliferación.

Trabajos posteriores en los que se emplearon adenovirus oncolíticos han demostrado la selectividad del promotor E2F-1 en el ciclo celular en diferentes líneas celulares normales y tumorales. Una característica importante de estos experimentos es que el promotor de E2F-1 ha sido colocado inmediatamente antes o después del promotor de E1A (región temprana del adenovirus 1A) (Johnson et al. 2002, Tsukuda et al. 2002, Jakubezak et al. 2003) lo que podría sugerir la posibilidad de que este promotor pueda ser utilizado en conjunto con otros promotores.

En el presente trabajo se realizó la clonación de tres diferentes fragmentos del promotor de E2F-1 (fig. 21) como primer paso para la construcción de transgenes que se encuentren regulados de forma dependiente del ciclo celular para terapia génica contra gliomas.

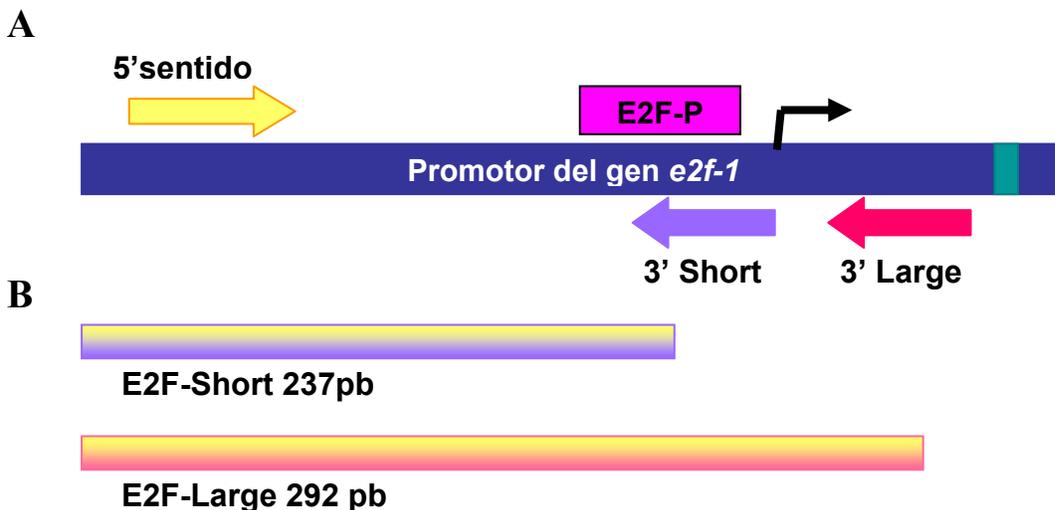


Figura 21: Fragmentos del promotor de E2F-1.

En **A** se muestra un esquema del promotor de E2F-1 en el cual se indican las posiciones del fragmento E2F-P y los oligonucleótidos 5' sentido, 3' short y 3' large para la amplificación de los fragmentos E2F-Short y E2F- Large. \blacktriangleright simboliza la señal de inicio de la transcripción, \blacksquare simboliza el codón de inicio de la traducción.

En **B** se muestran los esquemas de los fragmentos E2F-Short t E2F-Large amplificados por PCR.

El plásmido que se empleó para clonar los diferentes fragmentos del promotor E2F-1 fue pBluescript SK+. Una de las propiedades de este plásmido es tener el sitio múltiple de clonación dentro del gen de Lac Z lo que en caso de tener algún inserto, interrumpe la expresión de β -galactosidasa dando la facilidad de seleccionar colonias positivas (blancas)

en placas de agar que contengan Ampicilina, X-gal e IPTG (Alting-Mees y Short 1989).

Los fragmentos E2F-Short, E2F-Large obtenidos mediante PCR, y el ADN sintético de doble cadena E2F-P, fueron clonados dentro del plásmido pBluescript SK+, seleccionados mediante análisis de restricción y posteriormente secuenciados, dando lugar a tres plásmidos diferentes: pBlueE2F-Short, pBlueE2F-Large y pBlueE2F-P.

Debemos notar, que en los plásmidos pBlueE2F-Short y pBlueE2F-Large, se encontraron diferencias con la secuencia del promotor de E2F-1 humano reportada por Neuman y colaboradores en 1994. Tanto en el plásmido pBlueE2F- Short como en el plásmido pBlueE2F- Large las diferencias se encuentran en la base 50 en la que el resultado de la secuenciación muestra una timina (T) en lugar de una citosina (C) y en la base 93 donde se observa una C en lugar de una T (figs. 11 y 16); si esta diferencia se debe a un polimorfismo en el ADN empleado o a un error en la PCR, no lo hemos aclarado.

Las diferencias encontradas en las secuencias de los plásmidos pBlueE2F-Short y pBlueE2F-Large no se encuentran en las regiones de unión a E2F (5' TTT SS CGC 3', S=C/G), sólo el cambio en la base 50 se encuentra en un extremo de un sitio de unión para el factor de transcripción SP1 (fig. 22) por lo que pensamos, no afectará a la propiedad selectiva del promotor.

Promotor de E2F-1

```
1 ggggagtcag accgcgctg gtaccatccg gacaaagcct gcgcgcgccc cgccccgcca  
61 ttggccgtac cgccccggcg cgccgcccca tccgcccct cgccgccggg tccggcgcgt  
121 taaagccaat aggaaccgcc gccgtgttc ccgtcacggc cggggcagcc aatgtggcg  
181 gcgctcggcg gctcgtggct cttcgcggc aaaaaggatt tggcggtaa aagtggc→cg  
241 gactttgcag gcagcggcgg ccgggggcgg agcgggatcg agccctgcc gaggcctgcc  
301 gccatgggcc cgcgcccgcg ccgccgctg tcaccgggc cgcgcgggcc gtgagcgtca  
361 tg
```

Figura 22: Secuencia del promotor del gen de *e2f-1*.

Los sitios de unión del promotor a los diferentes factores de transcripción se encuentran indicados de la siguiente manera: **MBF-1**, **Sp-1**, caja **CCAAT**, **E2F**, **NF-κB**. El símbolo **→** indica la señal de inicio de la transcripción, **atg** indica el codón de inicio de la traducción y los nucleótidos subrayados son en los que se encontraron diferencias en la secuenciación de los plásmidos pBlueE2F-Short y pBlueE2F-Large.

¿Por qué clonar tres fragmentos diferentes del promotor E2F-1?

El promotor de E2F-1 cuenta con secuencias de unión a otros factores transcripcionales como SP-1 y NF κ -B además de dos sitios de unión a E2F. (Neuman et al. 1994). El plásmido pBlueE2F-Short contiene el fragmento E2F-Short el cual, tiene como característica principal el terminar antes del sitio de inicio de la transcripción, esto tiene dos propósitos, el primero es poder utilizar el promotor de E2F-1 junto con los sitios de unión a otros factores de transcripción que, en el caso de SP1, se ha demostrado que actúa de forma sinérgica con E2F en los promotores de DHFR (dihidrofolato reductasa) y TK de ratón (Lin et al. 1996, Karlseder et al. 1996).

El segundo propósito por el cual el fragmento E2F-Short termina antes del sitio de inicio de la transcripción es clonar este fragmento junto a un promotor específico de tejido. Esta combinación de promotores pretende aprovechar la flexibilidad reguladora de los promotores al no tener una organización definida de los sitios de unión a proteínas que regulan la transcripción (Struhl 1991, He y Rosenfeld 1991), con esta característica se espera que la expresión del transgén se lleve a cabo de forma dependiente del ciclo celular específica de tejido.

Por otro lado, el fragmento de E2F-1 clonado para formar el plásmido pBlueE2F-Large finaliza antes del codón de inicio de la traducción, por lo que incluye los sitios de unión para los diferentes factores de transcripción y el sitio de inicio de la transcripción que regulan la expresión del gen e2f-1 (Neuman et al. 1994).

El fragmento que en este trabajo llamamos E2F-Large ha sido utilizado en modelos de terapia génica dirigiendo transgenes (Parr et al. 1997) o regulando la expresión de adenovirus oncolíticos de forma dependiente del ciclo celular, en este caso, el fragmento E2F-Large, fue clonado inmediatamente antes (Johnson et al. 2002, Jakubezak et al. 2003) o después (Tsukuda et al. 2002) de los promotores de genes virales, lo que indica que puede regular la expresión de genes de forma dependiente del ciclo celular.

Por otra parte, el fragmento E2F-P sólo cuenta con la secuencia de los dos sitios de unión a E2F que contiene el promotor de E2F-1. El fragmento E2F-P fue diseñado y clonado en el plásmido pBluescript SK+ con el fin de posteriormente clonarlo antes de un promotor específico de tejido para regular la expresión de transgenes de forma dependiente del ciclo celular y específica de tejido.

El diseño del fragmento E2F-P se basa en dos hechos; el primero es la evidencia de la función de los sitios de unión a E2F en promotores dependientes del ciclo celular en la transición de la fase G1 a S del ciclo celular.

La mutación de las secuencias reguladoras de E2F en los promotores E2F-1, DHFR y TK de ratón (Jakubezak et al. 2003, Karlseder et al. 1994 y Lin et al. 1996) resulta en una expresión basal de genes reporteros no regulada por el ciclo celular. Esto demuestra que aunque los sitios de E2F-1 no son necesarios para la transcripción de genes, si son indispensables para regularla de forma dependiente del ciclo celular.

El segundo hecho por el cual el fragmento E2F-P sólo incluye los sitios de unión a E2F se debe a que se ha demostrado que la clonación de promotores sintéticos que contienen secuencias reguladoras repetidas, antes de un transgen con un promotor incluido, han sido suficientes para regular e incluso aumentar la expresión de transgenes de forma tejido-específica, tal es el caso de secuencias específicas de neuronas noradrenérgicas (Hwang et al. 2001) y de un elemento “intensificador” de TK de humano y de ratón (Siders et al. 1996) para la transcripción específica de células con pigmento.

La clonación de los fragmentos E2F-Short, E2F-Large y E2F-P en el plásmido pBluescript SK+ es el primer paso para la construcción de transgenes que se puedan regular de forma dependiente del ciclo celular. La ventaja de la obtención de los plásmidos pBlueE2F es que se conserva gran parte del sitio múltiple de clonación del pBluescript SK+ lo que nos da diferentes alternativas de sitios de restricción para facilitar la subclonación de estos fragmentos del promotor en diferentes plásmidos de expresión.

Conclusiones

Se lograron clonar tres fragmentos de diferente tamaño del promotor E2F-1 en el vector pBluescript SK+, obteniendo así los siguientes plásmidos:

- pBlueE2F-Short
- pBlueE2F-Large
- pBlueE2F-P

Perspectivas

El presente trabajo de tesis es el primer paso de un proyecto de terapia génica contra gliomas. El siguiente paso en este proyecto es clonar cada uno de los tres fragmentos del promotor E2F-1 antes de un promotor específico para células gliales con el fin de construir un promotor quimérico, que sea capaz de regular la expresión de genes reporteros y terapéuticos, de forma dependiente de la proliferación y específica de tejido.

Apéndice 1

Ensayos de miniprep, por el método de lisis alcalina (Sambrook et al. 1989).

- ✓ Centrifugar las bacterias durante 2min a 12,000 rpm y descartar el sobrenadante.
- ✓ Agregar 200µl de Buffer de resuspensión (glucosa 50mM, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10mMEDTA pH 8.0), resuspender con vortex.
- ✓ Agregar 200µl de solución de lisis (0.2 NaOH) y 1% SDS), mezclar suavemente invirtiendo los tubos varias veces.
- ✓ Agregar 200µl de solución de precipitación (60ml de acetato de potasio 5M, 11.5ml de ácido acético glacial y 28.5ml de H₂O) mezclar bien invirtiendo los tubos varias veces.
- ✓ Centrifugar los tubos a 12,000 por 3min
- ✓ Succionar los sobrenadantes y colocarlos en tubos nuevos de 1.5ml. Agregar 500µl de isopropanol y mezclar bien.
- ✓ Centrifugar a 12000rpm durante 5min (temperatura ambiente).
- ✓ Descartar los sobrenadantes. Agregar 500µl de etanol al 70%, mezclar con vortex y centrifugar a 12000rpm durante un minuto.
- ✓ Eliminar los sobrenadantes. Centrifugar por 15seg y aspirar el líquido sobrante de los tubos.
- ✓ Agregar 70µl de H₂O bidestilada y desionizada y resuspender el ADN.

Apéndice 2

Protocolo para eliminar RNA de los ensayos de miniprep utilizando RNAasa. (Promega protocols and applications guide 1991 2nd ed. Promega corporation U.S.A.).

- ✓ Agregar 1.4µl de RNAasa A (Boehringer Mannheim) previamente preparada como se indica a continuación: 1µg/ µl en una solución de 10mM Tris-HCl pH 7.5, 15mM NaCl, calentar por 15min a 100° C y enfriar a temperatura ambiente.
- ✓ Incubar por 20min a 37° C.
- ✓ Agregar 1 volumen de una mezcla de cloroformo, alcohol isoamílico y fenol (la mezcla se realiza poniendo 25 volúmenes de cloroformo, 1 volumen de alcohol isoamílico y 24 volúmenes de fenol), mezclar con vortex (un par de segundos) y centrifugar a velocidad máxima por 15seg.
- ✓ Tomar la fase acuosa (fase superior) y colocarla en un tubo nuevo que contenga 300µl de etanol al 100% y 30µl (aprox. 0.1vol del volumen total) de acetato de sodio al 3M pH 5.2 (para mejorar la precipitación se puede incubar a -70° C durante 15min)
- ✓ Centrifugar por 15min a 12 000 rpm y desechar el etanol
- ✓ Lavar con 200µl de etanol al 70%
- ✓ Centrifugar nuevamente, desechar el etanol, calentar por 3min a 65° C para evaporar el etanol restante
- ✓ Resuspender en 30µl de H₂O bidestilada y desionizada en un baño a 65° C.

Referencias

- Adams P. D. 2001. Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochim. Biophys. Acta.* 1471 M123-M133.
- Alting-Mees M. A., Short J. M. 1989. pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucl. Ac. Res.* 17:9494
- Bartek J., Bartkova J., Lukas J. 1997. The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer. *Exp. Cell. Res.* 237:1-6.
- Benitez J. A., Segovia J. 2003. Gene therapy targeting in the central nervous system. *Curr. Gen. Ther.* 3:127-145.
- Bögler O., Huang H.-J., Kleihues P., Cavenee W. K. 1995. The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia* 15:308-327.
- Castro M. G., Cowen I. K., Williamson I. K., David A., Jimenez-Dalmaroni M. J., Yuan X., Bigliari A., Williams J. C., Hu J., Lowenstein P. R. 2003. Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors. *Pharmacol. Ther.* 98:71-108.
- Collins V. P. 1995. Gene amplification in human gliomas. *Glia* 15:289-296.
- Constantini L. C., Bakowska J. C., Breakefield and Isacson O. 2000. Gene therapy in the CNS. *Gen. Ther.*, 7:93-109.
- DeGregori J., Kowalik T., Nevins J. R. 1995a. Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis and G1/S regulatory genes. *Mol. Cell. Biol.* 15:4215-4224.
- DeGregori J., Leone G., Ohtani K., Miron A., Nevins J. R. 1995b. E2F-1 accumulation bypasses a G1 arrest resulting from the inhibition of G1 cyclin-dependent kinase activity. *Genes Dev.* 9:2873-2887.
- DeGregori J., Leone G., Miron A., Jakoi L., Nevins J. R. 1997. Distinct roles for E2F proteins in cell growth control and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:7245-7250.
- Dynlacht B. D., Flores O., Lees J. A., Harlow E. 1994. Differential regulation of E2F trans-activation by cyclin/cdk2 complexes. *Genes Dev.* 8:1772-1786.

Dyson N. 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12:2245-2262.

Farnham P. J., Slansky J. E., Kollmar R. 1993 The role of E2F in the mammalian cell cycle. *Biochim. Biophys. Acta.* 1155:125-131.

Flemington E. K., Speck S. H., Kaelin Jr. W. G. 1993. E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6914-6918.

Harbour J. W., Dean D. C. 2000. The Rb/e2F pathway : expanding roles and emerging paradigms. *Genes. Dev.* 14:2393-2409.

He J., Allen J. R., Collins V. P., Allalunis-Turner J., Godbout R., Day, III R. S., James C. D. 1994. CDK4 amplification is an alternative mechanism to p16 gene homozygous deletion in glioma cell lines. *Cancer Res.* 54:5804-5807.

He S., Cook B. L., Deverman B. E., Weihe U., Zhang F., Prachand V., Zheng J., Weintraub S. J. 2000. E2F is required to prevent inappropriate S-phase entry of mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 20:363-371.

He X., Rosenfeld M. 1991. Mechanisms of complex transcriptional regulation: implications for brain development. *Neuron* 7:183-196.

Helin K., Wu C.-L., Fattaey A. R., Lees J. A., Dynlacht B. D., Ngwu C., Harlow E. 1993. Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative *trans*-activation. *Genes Dev.* 7:1850-1861.

Hermanson M., Funa K., Koopmann J., Maintz D., Waha A., Westermark B., Heldin C.-H., Wiestler O. D., Louis D. N., von Deimling a., Nistér M. 1996. Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high Paleted derived Grow Factor α receptor expression in human malignant gliomas. *Cancer Res.* 56:164-171.

Holland E. C. 2001. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat. Rev. Genet.* 2:120-129.

Hisao K.-M., McMahon S. L., Farnham P. J. 1994. Multiple DNA elements are required for the growth regulation of the mouse E2F1 promoter. *Genes Dev.* 8:1526-1537.

Hwang D.-Y., Carlezon Jr. W. A., Isacson O., Kim K.-S. 2001. A high-efficiency synthetic promoter that drives transgene expression selectively in noradrenergic neurons. *Hum. Gen. Ther.* 12:1731-1740.

Jakubezac J. L., Ryan P., Gorziglia M., Clarke L., Hawkins L. K., Hay C., Huang Y., Kaloss M., Marinov A., Phipps S., Pinkstaff A., Shirley P., Skripehenko Y., Stewart D., Forry- Schaudies S., Hallenbeck P. L. 2003. An oncolytic adenovirus selective for retinoblastoma tumor suppressor protein pathway-defective tumors: dependence on E1A, the E2F-1 promoter, and viral replication for selectivity and efficacy. *Cancer Res.* 63:1490-1499.

Johnson D. G., Schwarz J. K., Cress W. D., Nevins J. R. 1993. Expression of transcription factor E2F-1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* 365:349-352.

Johnson D. G., Ohtani K., Nevins J. R. 1994. Autoregulatory control of E2F1 expression in response to positive and negative regulators of cell cycle progression. *Genes Dev.* 8:1514-1525.

Johnson L., Shen A., Boyle L., Kunich J., Pandey K., Lemmon M., Hermiston T., Giedlin M., McCormick F., Fattaey A. 2002. Selectively replicating adenoviruses targeting deregulated E2F activity are potent, systemic antitumor agents. *Cancer Cell.* 1:325-337.

Karlseder J., Rotheneder H., Wintersberger E. 1996. Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F. *Mol. Cell. Biol.* 16:1659-1667.

Laws JR E. R., Shaffrey M. E. 1999. The inherent invasiveness of cerebral gliomas: implications for clinical management. *Int. J. Dev. Neurosc.* 17:413-420.

Lin S.-Y., Black A. R., Kostic D., Pajovic S., Hoover C. N., Azizkhan J. C. 1996. Cell cycle-regulated association of E2F1 and Sp1 is related to their functional interaction. *Mol. Cell. Biol.* 16:1668-1675.

Maher E. a., Furnari f. B., Bachoo R. M., Rowitch D. H., Louis D. N., Cavenee W. K., DePinho R. A. 2001. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev.* 15:1311-1333.

Miller N. and Whelan J. 1997. Progress in transcriptionally targeted and regulatable vectors for genetic therapy. *Hum. Gene Ther.* 8:803-815.

Neetlebeck, D. M, Jérôme, V. and Müller, R. 2000. Gene therapy designer promoters for tumor targeting. *Trends genet.* 16:174-181.

Nevins J. R. 1992. E2F: a link between the Rb tumor supressor protein and viral oncoproteins. *Science* 258:424-429.

Neuman E., Flemington E. K. Sellers W. R., Kaelin JR. W. G. 1994. Transcription of the E2F-1 gene is rendered cell cycle dependent by E2F DNA binding sites within its promoter. *Mol. Cell Biol.* 14:6607-6615.

Parr M. J., Manome Y., Tanaka t., Wen P., Kufe D. W., Kaelin JR. W. G., Fine H. A. 1997. Tumor-selective transgene expression in vivo mediated by an E2F-responsive adenoviral vector. *Nat. Med.* 3: 1145-1149.

Pietsch T., Wiestler O. D., 1997. Molecular neuropathology of astrocytic brain tumors. *J. Neuro-oncol.* 35:211-222.

Plate K. H., Risau W. 1995. Angiogenesis in malignant gliomas. *Glia* 15:339-347.

Polager S., Kalma Y., Berkovich E., Ginsberg D. 2002. E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene* 21:473-446.

Promega protocols and applications guide 1991 2nd ed. Promega corporation U.S.A.

Ren B., Cam H., Takahashi Y., Volkert T., Terragni J., Young R. A., Dynlacht B. D. 2002. E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication and G2/M checkpoints. *Genes Dev.* 16:245-256.

Sambrook J, Fritsch E.F., Maniatis T. 1989 Molecular cloning 2nd.ed Cold Spring Harbor Laboratory Press U.S.A págs 1.25-1.28)

Segovia J., Vergara P., Brenner M. 1998. astrocyte-specific expresión of tyrosine hydroxylase alter intracerebral gene transfer induces behavioral recovery in experimental Parkinsonism. *Gene Ther.* 5:1650-1655.

Shan B., Durfee T., Lee W.-H. 1996. Disruption of RB/E2F-1 interaction by single point mutations in E2F-1 enhances S-phase entry and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:679-684.

Sherr C. J. 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274:1672-1677.

Siders W. M., Halloran P. J., Fenton R. G. 1996. Transcriptional targeting of recombinant adenoviruses to human and murine melanoma cells. *Cancer Res.* 56:5638-5646.

Stanelle J., Stiewe T., Theseling C. C., Peter M., Pützer B. M. 2002. Gene expression changes in response to E2F1 activation. *Nucl. Ac. Res.* 30:1859-1867.

Struhl K. 1991. Mechanisms for diversity in gene expression patterns. *Neuron* 7:177-181

Takahashi Y., Rayman J. B., Dynlacht B. D. 2000. Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev.* 14:804-816.

Tatter S. B., Harsh IV G. R. 1998 Current treatment modalities for brain tumors surgery, radiation and chemotherapy. In *Gene Therapy for Neurological Disorders and Brain Tumors*. Eds. Chiocca E. A. and Breakefield X. O. Human Press Inc. United States of America, pp 161-189.

Trimarchi J. M., Lees J. A. 2002. Sibling rivalry in the E2F Family. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:11-20.

Tsukuda K., Wiewrodt R., Molnar-Kimber K., Jovanovic V. P., Amin K. M. 2002. An E2F-responsive replication selective adenovirus targeted to the defective cell cycle in cancer cells: potent antitumoral efficacy but no toxicity to normal cell. *Cancer Res.* 62:3438-3447.

Ueki K., Ono Y., Henson J. W., Efird J. T., von Deimling A., Louis D. N. 1996. CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res.* 56:150-153.

Von Deimling A., Louis D. N., Wiestler O. D. 1995. Molecular pathways in the formation of gliomas. *Glia* 15:328-338.

Wang Z. M., Yang H., Livingston D. M. 1998. Endogenous E2F-1 promotes timely G0 exit of resting mouse embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:15583-15586.

Wechsler-Reya R. and Scott M. P. 2001. The developmental biology of brain tumors. *Annu. Rev. Neurosci.* 24:385-428.

Zamorano A., Lamas M., Vergara P., Naranjo J. R., Segovia J. 2003. Transcriptionally mediated gene targeting of *gas1* to glioma cells elicits growth arrest and apoptosis. *J. Neurosc. Res.* 71:256-263.

Zhu Y., Parada L. F. 2002. The molecular and genetic basis of neurological tumours. *Nat. Rev. Cancer.* 2:616-626.