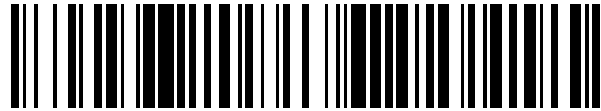


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 755**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2010 E 10809304 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2516676**

54 Título: **MITF como marcador para la predisposición al cáncer**

30 Prioridad:

21.12.2009 FR 0959325

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

28.04.2015

73 Titular/es:

INSTITUT GUSTAVE ROUSSY (33.3%)

39, rue Camille Desmoulins

94805 Villejuif Cédex, FR;

UNIVERSITÉ NICE SOPHIA ANTIPOLIS (33.3%) y

INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET

DE LA RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)

72 Inventor/es:

BALLOTTI, ROBERT;

BERTOLOTTO, CORINE;

BRESSAC DE PAILLERETS, BRIGITTE;

DE LICHY, MAHAUT y

LESUEUR, FABIENNE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 534 755 T3

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

DESCRIPCIÓN

MITF como marcador para la predisposición al cáncer

La presente solicitud se refiere al ámbito médico y, más en particular, al de la determinación de una predisposición a desarrollar un cáncer.

5 En aproximadamente el 5% de los cánceres, las mutaciones constitucionales que activan los oncogenes o que inactivan los genes supresores de tumores (denominados genes importantes o con efectos fuertes) confieren a los portadores un alto riesgo (superior al 50% en el transcurso de la vida) de desarrollar un cáncer, están en el origen de las formas familiares, de la aparición en un sujeto joven o de episodios múltiples. La expresión de la enfermedad puede variar bajo la influencia de otros factores genéticos (denominados modificadores, genes con efectos débiles) o ambientales. La identificación de las personas en riesgo permite que se puedan beneficiar de medidas de prevención y de vigilancia dirigidas a una detección precoz. En algunos casos, la mutación germinal constitucional puede orientar el tratamiento antineoplásico, como es el caso de los tratamientos anti-PARP en las pacientes portadoras de mutaciones germinales de BRCA1 y BRCA2 (Hennessy B. T. J., *JCO*, 2010, 28, 3570-3576).

10 El melanoma es un tumor maligno de los melanocitos. Se trata de uno de los cánceres de piel más infrecuentes, pero es la causa de la mayoría de muertes debidas al cáncer de piel. A pesar de los muchos años de investigación intensiva, el único tratamiento eficaz es la extirpación quirúrgica del tumor primario antes de que alcance un grosor de más de 1 mm. Según un informe de la OMS, hay aproximadamente 48.000 muertes al año relacionadas con los melanomas. En varios estudios se ha debatido si en los pacientes con melanomas cutáneos aumenta el riesgo de desarrollar un cáncer de mama, un linfoma o un cáncer de riñón.

15 En cuanto al melanoma, hasta la fecha se han identificado dos genes con efecto fuerte, *CDKN2A* que codifica las proteínas p16^{INK4A} y p14^{ARF}, y *CDK4*. El factor ambiental principal es la exposición a los rayos UV. Los genes conocidos que tienen efectos débiles son principalmente genes que codifican proteínas implicadas en la pigmentación, de los que *MC1R* es el más estudiado hasta la fecha. En el 50% de las familias con tres casos de melanoma no se ha identificado un gen de predisposición.

20 En este contexto, los inventores han estudiado que el gen *MITF*, el gen principal de regulación del melanocito (1) y oncogén (2, 3), puede ser un gen candidato de predisposición al melanoma. El MITF es un factor de transcripción de la familia bHLH-LZ que desempeña una función importante en la supervivencia y en el desarrollo de los melanocitos. El MITF interviene en la regulación de la melanogénesis. La función del MITF no es corriente porque es a la vez inductor y represor de la proliferación celular. En efecto, este factor es necesario, por una parte, para la diferenciación terminal de los melanocitos y/o la pigmentación y, por otra parte, para el comportamiento maligno que induce la proliferación celular. Las mutaciones constitucionales por «pérdida de función» del MITF están asociados a las enfermedades autosómicas dominantes, en particular el síndrome de Waardenburg y el síndrome de Tietz, que se caracterizan por una sordera con anomalías de pigmentación de la piel, del cabello y/o del iris.

25 El gen *MITF* comprende 9 exones. Se han identificado seis isoformas del MITF. En los humanos se definen por regla general como las isoformas 1 a 6, en donde la isoforma 4 es la más conocida con el nombre de isoforma M. En el ratón se utiliza bastante la nomenclatura con letras. Estas isoformas se transcriben desde promotores específicos. Además, se distinguen por su región del extremo amino y contienen todos los exones de 2 a 9 puesto que el exón 1 es el específico de cada isoforma (1). La isoforma 4, que se denomina con más frecuencia MITF-M, se diferencia de las otras isoformas por una inserción de seis aminoácidos. Esta isoforma se ha detectado solo en los melanocitos o en las células transformadas *in vivo* (nevo, melanoma, etc) o derivadas *in vitro* (líneas). Las otras isoformas se expresan en muchos tejidos y líneas celulares, a veces también con especificidad de tejido.

30 La solicitud de patente internacional WO 00/47765 da a conocer que el ajuste alternativo del gen *MITF* produce los transcritos mitf+ y mitf- que codifican proteínas que difieren en la inserción de seis aminoácidos adicionales en mitf+. La expresión de mitf+ y de mitf- predomina en las células sanas y tumorales, respectivamente. Esta solicitud de patente da a conocer, así pues, un procedimiento semicuantitativo para evaluar, predecir o vigilar el riesgo y el tratamiento de los melanomas. De igual forma, la solicitud de patente internacional WO 05/116249 describe un procedimiento cuantitativo basado en estas variantes de ajuste del MITF.

35 Cronin et al. (*Pigment Cell & Melanoma Research*, 2009, 22, 435-444) y Yokoyama et al. (*Pigment Cell & Melanoma Research*, 2009, 22, 376-377) describen las mutaciones del gen *MITF* identificadas en las muestras de melanoma. En Murakami et al. (*Pigment Cell Research*, 2005, 18, 265-277) se describe el efecto de la sumoilación sobre la actividad transcripcional del *MITF*. Miller et al. (*J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 146-155) describe mutaciones sobre los sitios de la sumoilación del MITF que impiden la sumoilación y modifican la actividad transcripcional del *MITF*.

40 En la presente invención, los inventores han identificado una mutación constitucional recurrente del gen *MITF*, denominada aquí E318K (según la nomenclatura de la isoforma 4), que es útil como marcador de la predisposición al cáncer.

45 El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones. Los elementos que quedan fuera de este alcance se aportan sólo con fines informativos.

El gen *MITF* (factor de transcripción asociado a la microftalmia) lo conoce bien el experto en la técnica y se puede caracterizar por su referencia en las bases de datos tales como UniGene (Hs.166017), HomoloGene (4892) y GeneID (4286). También se denomina MI, WS2A o bHLHe32.

5 Esta mutación E318K está localizada en el exón 9 del gen *MITF*, en particular, en la posición 952 de la isoforma M según la nomenclatura HGVS. Consiste en la sustitución de un nucleótido G por un nucleótido A (c.952G>A) y da lugar a la sustitución de un ácido glutámico por una lisina (p.Glu318Lys). Este exón 9 está en todas las variantes de ajuste del MITF. En la isoforma MITF-M, este resto se encuentra en la posición 952 del transcrito y provoca la mutación del aminoácido de la posición 318. La terminología «mutación E318K» designa la mutación, cualquiera que sea su posición en las isoformas del MITF. En particular, la posición del nucleótido mutado y del aminoácido en las diferentes variantes de ajuste se indica a continuación.

Isoforma	Otro nombre	Ref. Transcrito	Ref. Proteína	Mutación	SEQ ID n.º
ISOFORMA 1	MITF-A	NM_198159	NP_937802	E419K	35
ISOFORMA 2	MITF-H	NM_198177	NP_937820	E403K	36
ISOFORMA 3	MITF-C	NM_006722	NP_006713	E418K	37
ISOFORMA 4	MITF-M	NM_000248	NP_000239	E318K	38
ISOFORMA 5		NM_198158	NP_937801	E312K	39
ISOFORMA 6		NM_198178	NP_937821	E394K	40

El mutante E318K del MITF tiene una actividad más fuerte que el MITF silvestre con respecto a la activación de la transcripción del gen *HIF1A*, el cual se sabe que desempeña una función importante en la carcinogénesis renal (activado secundariamente por las mutaciones de «pérdida de función» de los genes de predisposición al cáncer de riñón, tales como VHL, FH, SDHB). Además, se ha establecido que esta mutación disminuye la sumoilación del MITF, lo que influye así quizás en la estabilidad de la proteína o en la cantidad de proteínas codificadas por los genes diana. En efecto, el aminoácido E318 forma parte de uno de esos sitios de sumoilación de la proteína MITF. El gen *MITF*, que codifica un factor de transcripción, la proteína MITF con la mutación E318K, es capaz de activar constitutivamente algunos de sus genes diana. También es posible que la mutación cambie la localización de la proteína MITF o su distribución entre el núcleo y el citoplasma.

Los inventores han descubierto que el mutante E318K del MITF está más representado en los pacientes que presentan un melanoma maligno cutáneo junto con un cáncer de riñón. De igual forma, la mutación estaría más representada en los sujetos que han desarrollado un melanoma cutáneo maligno y un cáncer de riñón o en las familias que presentan melanomas y cánceres de riñón entre sus miembros, o un melanoma cutáneo y otro cáncer, en particular una poliglobulia o un linfoma. Este mutante está presente con muy baja frecuencia (2/2846 sujetos en una primera cohorte, o sea, una frecuencia de heterocigotos del 0,0007, y 11/1824 sujetos en una segunda cohorte, o sea, una frecuencia de heterocigotos del 0,003) en los sujetos sin control. Los inventores han demostrado que la forma sin sumoilación del *MITF* conduce a una menor diferenciación de los melanocitos y a células más proliferativas.

Por otro lado, es probable que este mutante esté igualmente más representado en los sujetos que han desarrollado uno o varios tumores de la cresta neural, tales como el cáncer neuroendocrino, un sarcoma, un neuroblastoma o un tumor del sistema nervioso (TSN), u otros tipos de cánceres, según los resultados preliminares de los inventores, tales como un linfoma, un cáncer de pulmón, un cáncer de riñón, un cáncer de mama, un cáncer de páncreas, un tumor infantil, un cáncer del sistema hematopoyético, un cáncer del aparato digestivo, una poliglobulia o una combinación de estos tipos de cáncer. Los sitios de sumoilación comprenden clásicamente el motivo consenso W-K-X-E en el cual W es un aminoácido hidrófobo y X es cualquier aminoácido. El MITF posee dos sitios de sumoilación: el primer sitio tiene la secuencia IKRE (con la K en la posición 289, 273, 288, 182, 182 y 126 de las isoformas 1, 2, 3, 4, 5, y 6, respectivamente) y el segundo sitio que tiene la secuencia IKQE (con la K en la posición 417, 401, 416, 316, 310 y 254 de las isoformas 1, 2, 3, 4, 5, y 6, respectivamente). Las mutaciones de K182 y K316 aumentan la transcripción de un gen diana, melastanina/TRPM, pero no influyen en la capacidad que tiene la proteína para fijarse al ADN, ni en la localización ni en la estabilidad de la proteína (Miller A. J. et al., *JBC*, 2005, 280: 146-155).

Las enseñanzas obtenidas para el mutante E318K del MITF de la presente invención se pueden generalizar a cualquier mutación de MITF que disminuya o impida la sumoilación de la proteína MITF en uno de los sitios de la sumoilación o en los dos.

Por consiguiente, la presente descripción se refiere a un procedimiento para determinar si un sujeto tiene una predisposición o es susceptible de desarrollar un cáncer elegido entre la lista siguiente: un melanoma cutáneo maligno, un cáncer de riñón, un cáncer de la tiroides, un sarcoma, un neuroblastoma, un tumor del sistema nervioso central (TSNC), un linfoma, un cáncer de pulmón, una poliglobulia y las combinaciones de los mismos, que comprenden determinar, en una muestra biológica del sujeto, la presencia de una mutación en el MITF (factor de transcripción asociado a la microftalmia) que disminuye o impide la sumoilación del MITF, en donde la presencia de esta mutación indica que el sujeto tiene una predisposición o es susceptible de desarrollar tal cáncer. En un aspecto particular, en especial cuando la mutación de MITF es E318K (es decir, E318K en la isoforma 4 o la sustitución del resto de Glu correspondiente por un resto de Lys en las otras isoformas del MITF), el cáncer es un melanoma cutáneo maligno o una combinación de un melanoma cutáneo maligno y de otro cáncer, en particular un cáncer elegido entre un cáncer neuroendocrino, un sarcoma, un neuroblastoma o un tumor del sistema nervioso (TSN), un linfoma, un cáncer de pulmón, un cáncer de riñón, un cáncer de mama, un cáncer de páncreas, un tumor infantil, un cáncer del sistema hematopoyético, un cáncer del aparato digestivo, una poliglobulia y las combinaciones de los mismos. El cáncer puede asimismo elegirse entre un cáncer de riñón, un cáncer de tiroides, un sarcoma, un neuroblastoma, un tumor del sistema nervioso central (TSNC), un linfoma, un cáncer de pulmón, una poliglobulia y combinaciones de los mismos. En un modo de realización particular de la invención, la combinación es la de un melanoma cutáneo maligno y de un cáncer de riñón.

Preferiblemente, la mutación es una sustitución de un resto de lisina y/o de un resto de ácido glutámico de uno de los sitios de sumoilación del MITF o de los dos sitios. Así pues, la mutación es la sustitución de un resto seleccionado de la tabla siguiente por uno cualquiera de los otros 19 aminoácidos.

Isoforma	Ref. Transcrito	Ref. Proteína	Primer sitio de sumoilación		Segundo sitio de sumoilación	
ISOFORMA 1	NM_198159	NP_937802	K289	E291	K417	E419
ISOFORMA 2	NM_198177	NP_937820	K273	E275	K401	E403
ISOFORMA 3	NM_006722	NP_006713	K288	E290	K416	E418
ISOFORMA 4	NM_000248	NP_000239	K182	E184	K316	E318
ISOFORMA 5	NM_198158	NP_937801	K182	E184	K310	E312
ISOFORMA 6	NM_198178	NP_937821	K126	E128	K254	E256

Más preferiblemente, se puede sustituir un resto de lisina por uno cualquiera de los otros 19 aminoácidos; y/o se puede sustituir un resto de ácido glutámico por uno cualquiera de los otros 19 aminoácidos.

Preferiblemente, el procedimiento comprende la detección de una sustitución del resto «K316» (es decir, K316 en la isoforma 4 o el resto de Lys correspondiente en las otras isoformas del MITF) y/o del resto «E318» (es decir, E318 en la isoforma 4 o el resto de Glu correspondiente en las otras isoformas del MITF) por uno cualquiera de los otros 19 aminoácidos.

En un aspecto preferido, el procedimiento comprende la detección de una sustitución del resto «E318» (es decir, E318 en la isoforma 4 o el resto de Glu correspondiente en las otras isoformas del MITF) por uno cualquiera de los otros 19 aminoácidos. En un aspecto aún más preferido, el procedimiento comprende la detección de la mutación «E318K» (es decir, E318K en la isoforma 4 o la sustitución del resto de Glu por un resto de Lys correspondiente en las otras isoformas del MITF).

La mutación se puede detectar en la proteína o en el ácido nucleico. Las técnicas para identificar la mutación, tal como la definida a continuación en el gen *MITF* o en sus transcritos (ARNm), las conoce bien el experto en la técnica e incluyen en particular y de manera no exhaustiva la secuenciación, la hibridación selectiva y/o la amplificación selectiva. En el ácido nucleico, la detección puede hacerse en una muestra de ADN genómico, de ARNm o de ADNc.

En particular, la secuenciación del MITF puede ser completa o parcial. En efecto, el procedimiento puede comprender únicamente la secuenciación de la región que comprende el resto que se sospecha que está mutado e incluso únicamente la secuenciación de este resto concreto.

Por hibridación selectiva se entiende que el ADN genómico, el ARN o el ADNc se pone en presencia de una sonda específica del mutante de MITF y finalmente de una sonda de control específica del MITF que no presenta esta mutación o del MITF silvestre. Las sondas pueden estar en suspensión o estar inmovilizadas sobre un sustrato. Típicamente, las sondas se marcarán para que se puedan detectar con más facilidad. Las sondas son en particular

moléculas de ácido nucleico monocatenario de 8 a 1000 nucleótidos, preferiblemente de 10 a 800 o 15 a 50 nucleótidos.

El ácido nucleico se puede amplificar antes de la detección de la mutación. Así pues, se diseñará una pareja de cebadores específicos de las regiones que flanquean la posición de la mutación a detectar (es decir, delante y detrás de ella). Típicamente, los cebadores son moléculas de ácido nucleico monocatenario de 5 a 60 nucleótidos, preferiblemente de 8 a 25 nucleótidos. Es preferible que la complementariedad sea perfecta porque asegurará una alta especificidad. No obstante, se pueden tolerar algunas discordancias. Una vez que se ha hecho la amplificación del gen *MITF* o del exón que contiene la mutación, o incluso de uno de sus transcritos, el amplicón se utiliza para detectar la presencia de la mutación por secuenciación o hibridación específica o mediante cualquier técnica apropiada conocida por el experto en la técnica. De igual forma, la mutación se puede detectar mediante el análisis de las curvas de fusión (véase, por ejemplo, la patente internacional WO2007/035806).

De igual forma, la presencia de la mutación se puede detectar mediante la amplificación selectiva del mutante. Así pues, se prepara una pareja de cebadores, de los que uno de los cebadores se hibrida específicamente con la secuencia que lleva la mutación a detectar. Este cebador será capaz de iniciar la amplificación o de hibridarse con su diana únicamente si la secuencia lleva el nucleótido mutado. Por consiguiente, la presencia de un amplicón indicaría que el *MITF* lleva la mutación analizada, mientras que la ausencia de este amplicón indicaría que el *MITF* no presenta esta mutación.

Por supuesto, estas técnicas las puede adaptar fácilmente el experto en la técnica para detectar simultáneamente o en paralelo varias mutaciones de uno o de varios sitios de sumoilación. Así pues, las técnicas permitirían detectar una o varias mutaciones que codifican la sustitución de los restos seleccionados entre el grupo que consiste en K182, E184, K316 y E318 en la isoforma 4 del *MITF* o de los restos correspondientes en las otras isoformas del *MITF*.

Cuando hay que detectar la mutación en la proteína, el procedimiento utiliza un anticuerpo capaz de discriminar entre el *MITF* que presenta la mutación a detectar y el *MITF* que no presenta esta mutación. En particular, la muestra biológica se pone en contacto con un anticuerpo específico contra el *MITF* que presenta la mutación a detectar y se detecta la presencia del complejo inmunitario. Hay diferentes procedimientos para detectar estos complejos inmunitarios, como los procedimientos de ELISA, radioinmunoensayo (RIA) y los ensayos inmunoenzimáticos (IEMA). Con «anticuerpo» se designan por igual todos los fragmentos y derivados de anticuerpo que conservan la capacidad de fijarse específicamente al mutante de *MITF* a detectar respecto al *MITF* que no presenta esta mutación. De nuevo, estas técnicas las puede adaptar con facilidad el experto en la técnica para detectar simultáneamente o en paralelo varias mutaciones de uno o varios sitios de sumoilación. Así pues, las técnicas permitirían detectar una o varias sustituciones de los restos seleccionados entre el grupo que consiste en K182, E184, K316 y E318 en la isoforma 4 del *MITF* o de los restos correspondientes en las otras isoformas del *MITF*, por ejemplo, con ayuda de una combinación específica de anticuerpos contra cada mutante de *MITF* que presente una o varias de estas sustituciones.

Otra alternativa es que la mutación que disminuye o impide la sumoilación del *MITF* se puede detectar en la proteína de manera indirecta. Así pues, la presencia de la mutación se puede detectar al medir la sumoilación del *MITF*, en donde una disminución de la sumoilación respecto a la proteína *MITF* silvestre indica la presencia de la mutación. Los ejemplos detallan cómo se mide esta sumoilación. Del mismo modo, se estabiliza la mutación que disminuye la sumoilación, la proteína *MITF* mutada, y, por lo tanto, se puede detectar en los cortes de tejido mediante inmunohistoquímica o inmunofluorescencia. La detección de la mutación o de la presencia/ausencia de la sumoilación podría igualmente hacerse por espectrometría de masas (solicitud de patente internacional WO/2005/003390).

En un aspecto particularmente interesante de la presente descripción, la medición de la sumoilación del *MITF* se hace de manera indirecta mediante la determinación de la localización celular del *MITF*, que se detecta por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia. En efecto, de manera sorprendente y muy original, la disminución de la sumoilación de la proteína del *MITF* supone una modificación de la localización celular de la proteína del *MITF* visible mediante inmunohistoquímica en las células tumorales. La proteína silvestre presenta una localización única o esencialmente nuclear, mientras que la proteína que lleva la mutación que disminuye la sumoilación de la proteína, en concreto la mutación E318K, presenta una localización a la vez nuclear y citoplasmática. Así pues, la presente descripción se refiere a un procedimiento en el que la mutación que disminuye la sumoilación del *MITF* se detecta mediante la determinación de la localización celular del *MITF* en inmunohistoquímica, en donde una localización nuclear es indicativa de que la proteína del *MITF* es la silvestre, mientras que una localización nuclear y citoplasmática es indicativa de que la proteína del *MITF* presenta una mutación que disminuye la sumoilación del *MITF*, en concreto el *MITF* mutado en E318K. De igual forma, la mutación puede permitir la detección de la proteína del *MITF* por IHQ o IF en los tejidos en los que la forma silvestre es indetectable por estos mismos procedimientos.

La mutación se puede detectar en cualquier isoforma de *MITF*. En un aspecto particular, la mutación se detecta en la isoforma 4.

La terminología «sujeto» se refiere aquí a un mamífero, preferiblemente a un humano.

La terminología «muestra biológica» se refiere aquí a una muestra de tejido sano o tumoral, por ejemplo, a una biopsia y en particular a una biopsia de piel, de riñón, de tiroides o de pulmón, o de líquido biológico, por ejemplo, una muestra de sangre, de líquido cefalorraquídeo, de orina o de linfa. Preferiblemente, la muestra biológica es una muestra de sangre. Los procedimientos de la presente descripción pueden comprender una etapa preliminar de extracción de la muestra biológica.

Por supuesto, los procedimientos de la presente descripción tiene en cuenta también, además de la detección de la mutación que disminuye o impide la sumoilación del MITF, la detección de otros marcadores de predisposición al cáncer.

La presente descripción también hace referencia a la utilización de los medios de detección de la mutación que disminuye o impide la sumoilación del MITF para la preparación de un kit de diagnóstico destinado a determinar si un sujeto tiene una predisposición o una susceptibilidad para desarrollar un cáncer elegido de la lista siguiente: un melanoma cutáneo maligno, un cáncer neuroendocrino, un sarcoma, un neuroblastoma o un tumor del sistema nervioso (TSN), un linfoma, un cáncer de pulmón, un cáncer de riñón, un cáncer de mama, un cáncer de páncreas, un tumor infantil, un cáncer del sistema hematopoyético, un cáncer del aparato digestivo, una poliglobulia y las combinaciones de los mismos, en donde la presencia de esta mutación indica que el sujeto tiene una predisposición o susceptibilidad para desarrollar tal cáncer. En un aspecto concreto, el cáncer se elige entre un melanoma cutáneo maligno, un cáncer de riñón, un cáncer de la tiroides, un sarcoma, un neuroblastoma, un tumor del sistema nervioso central (TSNC), un linfoma, un cáncer de pulmón, una poliglobulia y combinaciones de los mismos. Preferiblemente, el cáncer se elige entre un melanoma cutáneo maligno, un cáncer de riñón y una combinación de los mismos. Los medios de detección pueden comprender o consistir en una sonda específica del MITF que lleva la mutación a detectar, una pareja de cebadores que permiten la amplificación de un segmento nucleotídico que comprende la mutación a detectar, una pareja de cebadores en la que uno de ellos se hibrida específicamente con la secuencia que lleva la mutación a detectar (que permite asimismo una amplificación selectiva del mutante de MITF a detectar), un anticuerpo específico del mutante de MITF a detectar, medios que permiten la detección y la medición de la sumoilación del MITF, controles negativos que permiten detectar el MITF que no presenta la mutación a detectar, o las combinaciones de los mismos. En un aspecto concreto, en particular cuando la mutación del MITF es E318K (es decir, E318K en la isoforma 4 o la sustitución del resto de Glu correspondiente por un resto de Lys en las otras isoformas del MITF), el cáncer es un melanoma cutáneo maligno o una combinación de un melanoma cutáneo maligno y de otro cáncer, en concreto de un cáncer elegido entre cáncer neuroendocrino, un sarcoma, un neuroblastoma o un tumor del sistema nervioso (TSN), un linfoma, un cáncer de pulmón, un cáncer de riñón, un cáncer de mama, un cáncer de páncreas, un tumor infantil, un cáncer del sistema hematopoyético, un cáncer del aparato digestivo, una poliglobulia y combinaciones de los mismos. En un aspecto concreto, el cáncer se elige entre un melanoma cutáneo maligno, un cáncer de riñón, un cáncer de tiroides, un sarcoma, un neuroblastoma, un tumor del sistema nervioso central (TSNC), un linfoma, un cáncer de pulmón, una poliglobulia o combinaciones de los mismos. De manera preferida, el cáncer se elige entre un melanoma cutáneo maligno, un cáncer de riñón y una combinación de los mismos.

El interés de la detección de una predisposición o de una susceptibilidad al cáncer es que el sujeto se puede beneficiar de un seguimiento clínico o de una vigilancia que permite detectar la aparición de un cáncer en un estadio precoz y, por lo tanto, aumentar las posibilidades de curación. Por otro lado, la detección de la mutación puede permitir la orientación del tratamiento terapéutico del paciente y/o aumentar la eficacia de los tratamientos. Por otro lado, el sujeto identificado puede asimismo beneficiarse de un tratamiento preventivo. Este tratamiento está destinado a impedir o retrasar la aparición del cáncer.

Así pues, la presente descripción se refiere también a un procedimiento para seleccionar los pacientes que pueden beneficiarse de un tratamiento preventivo o de una vigilancia médica que comprende la determinación de la susceptibilidad al cáncer que tiene el paciente mediante el procedimiento según la presente descripción y la selección de los sujetos que presentan la mutación que disminuye o impide la sumoilación del MITF.

El tratamiento preventivo contemplado puede comprender la administración de compuestos polifenólicos. En efecto, se ha demostrado en particular que los compuestos polifenólicos del salvado del arroz fermentado disminuyen la cantidad de la proteína del MITF (5). Así pues, este tratamiento podría hacer fracasar la disminución de la sumoilación de la proteína del MITF y sus consecuencias funcionales sobre sus genes diana, en donde el MITF es un factor de transcripción. Por otro lado, los polifenoles del té negro tienen una acción quimiopreventiva que podría deberse a una parada del ciclo celular y a un mecanismo proapoptótico (6). Por consiguiente, la presente descripción se refiere a la utilización de los compuestos polifenólicos en el tratamiento preventivo del cáncer en los sujetos que presentan una mutación del MITF que disminuye o impide la sumoilación del MITF y la utilización de los compuestos polifenólicos para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento preventivo del cáncer (quimiopreención) en los sujetos que presentan una mutación del MITF que disminuye o impide la sumoilación del MITF. Además se refiere a un procedimiento de tratamiento que comprende la administración de una dosis terapéutica eficaz de los compuestos polifenólicos a los sujetos que presentan una mutación del MITF que disminuye o impide la sumoilación del MITF, que previene o retrasa también la aparición de un cáncer. Preferiblemente, los compuestos polifenólicos son los compuestos polifenólicos del salvado del arroz fermentado o los polifenoles del té negro. La solicitud de patente internacional WO 05/099721 describe asimismo otros muchos compuestos polifenólicos útiles para la prevención del cáncer, en particular gracias a su efecto antioxidante.

La invención se entenderá mejor con la ayuda de los ejemplos que siguen, que tienen propósitos ilustrativos y no limitantes.

Breve descripción de las figuras

5 Figura 1: (figura 1a) Árbol genealógico de la primera familia con varios casos de melanomas en la que se ha identificado el mutante E318K del MITF; (figura 1b) electroforegrama de la mutación constitucional (sangre) de una persona con melanoma y cáncer de riñón.

Figura 2: Activación de la transcripción del promotor de *HIF1A*, pero no de *MET*, en presencia de la proteína del MITF que lleva la mutación E318K respecto a la proteína del MITF silvestre.

Figura 3: Disminución de la sumoilación de la proteína del MITF que lleva la mutación E318K.

10 Figura 4: La mutación E318K hace disminuir la sumoilación de la proteína del MITF. Figura 4a: Las células HEK293 se han cotransfectado con un plásmido que codifica el MITF silvestre o mutado (K182R; E318K; K182R/E318K) conjugado a la myc y un plásmido pSG5 vacío o que codifica His-SUMO1. Se han lisado las células hirviéndolas en un tampón y se ha analizado por transferencia Western la presencia de MITF y ERK2 para asegurarse de que la carga de cada carril fue suficiente. Figura 4b: Las células HEK293 se han cotransfectado con un plásmido que
15 codifica el MITF silvestre o mutado (K182R; E318K; K182R/E318K) conjugado a la myc y un plásmido pSG5 vacío o que codifica His-SUMO2. En las células se ha analizado por transferencia Western la presencia de MITF y ERK2. Figura 4c: Las células HEK293 se han cotransfectado con un plásmido que codifica el MITF silvestre o mutado (K182R; E318K; K182R/E318K) conjugado a la myc y un plásmido pSG5 vacío o que codifica His-SUMO1. Los
20 lisados celulares se han purificado en columnas Ni-NTA y se han analizado mediante transferencia Western en busca del MITF (panel superior). Se ha realizado una transferencia Western con los lisados celulares antes de la purificación para controlar la expresión del MITF y que cada carril ha recibido la carga suficiente (panel inferior).

Figura 5: La mutación E318K podría afectar a la localización celular del MITF y cambiar su actividad transcripcional. Figura 5a: Un análisis por inmunofluorescencia de las células HEK293 transfectadas con un plásmido que codifica el
25 MITF silvestre o mutado (K182R; E318K; K182R/E318K) conjugado a la myc y teñidas con un anti-myc seguido por un anticuerpo secundario antirratón marcado con Alexafluor 594. Los núcleos celulares han experimentado una coloración por contraste con DAPI. La barra representa 10 μ m. Figura 5b: Tinción inmunohistoquímica de los melanomas y de los cánceres de riñón con los anticuerpos anti-MITF (x200). Los melanomas con el MITF silvestre muestran una coloración nuclear mientras que los melanomas con el MITF mutado E318K muestran una coloración nuclear y citoplasmática. El cáncer de riñón con el MITF silvestre no muestra marcación, mientras que el cáncer de
30 riñón con el MITF que lleva la mutación E318K muestra una tinción nuclear y citoplasmática. Figura 5c: Las células HEL293 se han transfectado de manera transitoria con un plásmido delator con la luciferasa sintética que contiene 3 copias de una caja M y con un plásmido pCDNA3 vacío o que codifica el MITF silvestre o mutado. La actividad luciferasa se ha normalizado por la actividad de la β -galactosidasa y los resultados se han expresado como el factor de estimulación de la actividad luciferasa basal para las células sin estimular.

35 Figura 6: Los melanocitos mutantes muestran una pigmentación más tenue. El sedimento celular y la medición de la melanina en los melanocitos de dos donantes sanos respecto a los melanocitos aislados en una biopsia de piel de pacientes que presentan la mutación E318K. (***) indica una diferencia significativa con un valor de *p* inferior a 0,001 entre las pruebas. Los dos donantes, así como los portadores, son de raza blanca.

Figura 7: La mutación E318K confiere una ventaja respecto al crecimiento. Los melanocitos de ratón inmortalizados melan-a (izquierda), las células de melanoma humano metastásico A375 (centro) y las células de carcinoma renal humano RCC4 (derecha) se han transfectado con un vector vacío y un vector que codifica la proteína del MITF
40 silvestre (Mi-WT) o mutante (Mi-E318K). Se muestran fotos a las 2 semanas (arriba) y la absorbancia después de teñir/desteñir los clones con violeta de genciana (abajo).

Ejemplos

45 Ejemplo 1

Los inventores han estudiado el gen *MITF*, que se considera un oncogén y, por lo tanto, un gen candidato. Primero han estudiado si existían mutaciones del gen *MITF* (3p14) en el sitio de escisión por las caspasas (efecto antiapoptótico) en las familias con varios casos de melanoma (4), mediante la secuenciación de todas las isoformas. Sus resultados preliminares han mostrado la presencia de una variante germinal del MITF-M c.952G>A,
50 p.Glu318Lys (E318K), en una familia española de origen vasco (TRY) con varios casos de melanoma (con 2 cánceres de riñón, 3 tumores del sistema nervioso central, un cáncer de pulmón y un cáncer gástrico por la rama materna de la que procede la mutación E318K), con transmisión del lado paterno de un haplotipo 1p22. La variante estaba ausente en 180 controles franceses/raza blanca y 96 españoles vascos (Figura 1 a y b).

En las células de melanoma B16 (ratón), los inventores han demostrado que la variante del MITF, c.952G>A, p.Glu318Lys (E318K), inducía más que la forma silvestre la transcripción del gen *HIF1a*, pero no la del gen *MET* (figura 2). Por lo tanto, los inventores han planteado la hipótesis siguiente: HIF es el factor que transforma las células

renales en ausencia de VHL, en situación de hipoxia; VHL (mutaciones con pérdida de función de un gen supresor de tumores) y MET (mutaciones activadoras de un oncogén) son dos genes de predisposición al cáncer de riñón; así pues, el H11aF activado por el MITF mutado en E318K podría tener el mismo efecto que la ausencia de VHL. De modo que los inventores han demostrado que la mutación E318K del gen *MITF* estaba presente en 4/55 pacientes y ausente en 276 controles ($p = 0,0007$) de la subcolección «melanoma y cáncer de riñón (casos esporádicos)» de la colección MELARISK. Los inventores han explorado a continuación la frecuencia del mutante E318K en diferentes colecciones biológicas del IGR (Instituto Gustave Roussy, Villejuif, Francia). Se han identificado otros portadores de esta mutación: una paciente que ha desarrollado un cáncer de riñón juvenil con translocación TFE3 cuya madre había tenido un cáncer de mama y luego un melanoma, una paciente que ha desarrollado 3 melanomas y un linfoma; un caso inicial de una familia con varios casos de melanoma; un caso inicial que ha desarrollado varios melanomas; dos pacientes que han desarrollado melanomas nodulares; una paciente que ha desarrollado un melanoma y uno de sus tíos ha tenido un TSNC; dos pacientes que han desarrollado un cáncer papilar de riñón; un paciente con poliglobulia. En efecto, *VHL* es uno de los tres genes de predisposición a la poliglobulia.

Tabla 1: Resultados de la detección del mutante E318K del MITF

Melanoma y cáncer de riñón	N.º muestra	MITF silvestre	MITF E318K	Valor de p
Esporádico	55	51	4	0,0007
Familiar	50	49	1	0,1534
Esporádico y familiar	105	100	5	0,0015
Cáncer papilar de riñón	24	22	2	0,0062
Melanoma y TSNC, familiar			1	0,1687
Poliglobulia	14	13	1	0,0483
Linfoma	16	15	1	0,0548
Melanomas				
Varios melanomas familiares	107	106	1	0,2794
Varios melanomas esporádicos	34	33	1	0,1097
Melanomas nodulares	90	88	2	0,0600
Varios melanomas cutáneos familiares	49	48	1	0,1508

Las poblaciones de control utilizadas son las de donantes de sangre y del CEPH (N = 276).

Ejemplo 2

Identificación de las mutaciones germinales del MITF en los pacientes que presentan melanomas y cánceres de riñón

Con el objeto de confirmar la identificación de la variante del MITF procedente de una sustitución de aminoácido p.E318K (c.952G>A, en la isoforma M del *MITF*, NM_000248) relacionada con una coexistencia de melanomas y de cánceres de riñón, los inventores han secuenciado toda la secuencia codificante del gen, las uniones intrón-exón y los 8 promotores alternativos en 62 pacientes que presentan a la vez un melanoma y un cáncer de riñón. Los inventores han observado esta sustitución en 5 de los 62 pacientes. La frecuencia de esta variante es significativamente más alta que en una población de control de 1824 personas (4% frente al 0,3%, $p = 9,7 \cdot 10^{-5}$). De igual forma, portar la variante p.E318K hace aumentar 14 veces el riesgo de desarrollar a la vez un melanoma y un cáncer de riñón (riesgo relativo aproximado (OR) = 14,46 [intervalo de confianza del 95% = 3,79 a 46,82] (tabla 2)). Para confirmar que esta variante tiene un efecto sobre la susceptibilidad a un único melanoma, los inventores han genotipado 704 pacientes que presentan melanomas (que son negativos para las mutaciones de *CDKN2A* y *CDK4* que predisponen a los melanomas) que incluyen 422 casos independientes con antecedentes familiares de melanomas, 242 casos esporádicos con varios melanomas primarios y 40 casos esporádicos con un melanoma nodular (tabla 2). Se han analizado los últimos ya que 4 pacientes de los 5 que han desarrollado la vez un melanoma

y un cáncer de riñón y que portan la mutación p.E318K tienen al menos un melanoma nodular (aunque sea el tipo histológico de melanoma más infrecuente). La frecuencia de p.E318K es significativamente más elevada en todos los pacientes que presentan un melanoma único respecto a los controles (1,3% frente a 0,3%, $p = 4,5 \cdot 10^{-5}$) y el hecho de llevar la mutación p.E318K está asociado a un aumento del riesgo de melanoma de más de 4 veces (riesgo relativo aproximado (OR) = 4,57 [intervalo de confianza del 95% = 2,05 a 10,68]). Este aumento del riesgo parece deberse principalmente al grupo de pacientes esporádicos con varios melanomas primarios (riesgo relativo aproximado (OR) = 7,10 [intervalo de confianza del 95% = 2,67 a 18,62]), mientras que el efecto de p.E318K no era significativo en los pacientes con melanoma con antecedentes familiares de melanomas (riesgo relativo aproximado (OR) = 2,78 [intervalo de confianza del 95% = 0,91 a 7,90]) o en los pacientes con melanomas nodulares (riesgo relativo aproximado (OR) = 8,67 [intervalo de confianza del 95% = 0,9 a 41,70] (tabla 3)). No obstante, la prueba de homogeneidad de frecuencia del alelo p.E318K a través de estos tres grupos fue significativa solo de una forma marginal ($p = 0,06$). Había material biológico disponible de otros miembros afectados en tres de las siete familias sujetas a los melanomas en las cuales el candidato llevaba la variante. En cada una de estas familias, el p.E318K se cosegregó con el melanoma. De manera alternativa, para examinar el efecto de p.E318K sobre la susceptibilidad al cáncer de riñón, los inventores han genotipado esta variante en 187 pacientes que tienen un cáncer de riñón. La frecuencia de p.E318K era igualmente más elevada en los pacientes que tenían un cáncer de riñón que en los controles (1,3% frente a 0,3%, $p = 0,01$) y el aumento del riesgo de cáncer de riñón asociado al p.E318K era del mismo orden de magnitud que el observado para el melanoma solo (riesgo relativo aproximado (OR) = 4,53 [intervalo de confianza del 95% = 1,22 a 14,30]) (tabla 2). No había ninguna prueba significativa de una heterogeneidad de p.E318K respecto a la frecuencia del alelo a través de los tres grupos de pacientes (melanoma y cáncer de riñón, melanoma solo y cáncer de riñón solo; $p = 0,08$). El reagrupamiento de todos los pacientes aumenta la significación de la diferencia de frecuencia del alelo p.E318K entre los casos y los controles (1,5% frente a 0,3%; $p = 2,5 \cdot 10^{-7}$). En el conjunto, el riesgo de desarrollar un melanoma, un cáncer de riñón o los dos aumenta en más de 5 veces en los portadores de p.E318K (riesgo relativo aproximado (OR) = 5,17 [intervalo de confianza del 95% = 2,49 a 11,52]).

Para estimar si p.E318K predispone a la asociación entre melanomas y otro cáncer diferente al cáncer de riñón, los inventores han genotipado 172 pacientes afectados por un melanoma y otro tumor primario, pero no se pudo identificar ningún portador de p.E318K (tabla 2). Ya que la asociación de p.E318K con otro tumor primario es un acontecimiento infrecuente, los inventores han planificado la exploración de series más grandes.

Tabla 2: Frecuencia de la mutación germinal p.E318K del *MITF* en los pacientes que padecen cáncer

Tipo de tumor	Número de no portadores	Número de portadores*	Total	Frecuencia del alelo minoritario	Valor de p de FET	OR [IC95%]
Controles	1813	11	1824	0,003	-	Ref
CM y/o RCC	924	29	953	0,015	$2,5 \cdot 10^{-7}$	5,17 [2,49-11,52]
Los dos	57	5 ^a	62	0,040	$9,7 \cdot 10^{-5}$	14,46 [3,79-46,82]
CM solo ^b	685	19 ^c	704	0,013	$4,5 \cdot 10^{-5}$	4,57 [2,05-10,68]
RCC solo ^d	182	5 ^e	187	0,013	0,012	4,53 [1,22-14,30]
Melanoma y otro cáncer^f	172	0	172	0	0,61	-

OR = riesgo relativo aproximado, IC95% = intervalo de confianza del 95%; valor de p = probabilidad crítica de la prueba; CM = melanoma; RCC = cáncer de riñón.

*Todos los pacientes son heterocigotos para la variante p.E318K.

^aLos 5 pacientes han desarrollado un cáncer de riñón con células claras (ccRCC), 4 de los 5 pacientes han desarrollado al menos un melanoma nodular y el 5.º paciente ha desarrollado un melanoma de extensión superficial (SSM).

^bMelanomas familiares (en particular con al menos 2 casos confirmados de melanomas en la familia), 422 casos; casos esporádicos con varios melanomas primarios (MPM), 242 casos; melanoma nodular esporádico, 40 casos.

^cDe 19 portadores, 7 son de casos familiares, 9 son de casos esporádicos de MPM y 2 son de casos de melanoma nodular esporádico.

5 ^dCáncer de riñón de células claras (ccRCC), 54 casos esporádicos; carcinoma papilar renal (PCR), 55 casos (22 casos con un tipo I, 30 casos con un tipo II y 3 casos con un subtipo histológico desconocido); fenotipos del cáncer de riñón mixtos (en particular, papilar y de células claras), 2 casos; cáncer de riñón infantil, 5 casos; cáncer de riñón con un subtipo histológico desconocido, 71 casos.

10 ^eDe 5 portadores, uno es un caso de cáncer de riñón de células claras ccRCC, 2 son de casos de carcinoma papilar renal de tipo II, 1 es un carcinoma juvenil con una translocación somática t(X;17) (p11;q25) y 1 es un caso de carcinoma papilar renal de tipo I.

^fCáncer de mama, 97 casos, cáncer de cerebro, 27 casos, carcinoma de tiroides no medular, 28 casos, cáncer de colon, 10 casos; otros cánceres (testículo, útero, ovario, próstata, sarcoma y endometrio), 10 casos.

15 Prueba de homogeneidad de las frecuencias alélicas entre los melanomas solos, los cánceres de riñón solos y la combinación de los dos: $p = 0,078$ (prueba exacta).

Tabla 3: Frecuencia de la mutación germinal p.E318K de *MITF* en los pacientes que padecen melanoma solo

Tipo de tumor	Número de no portadores	Número de portadores*	Total	Frecuencia del alelo minoritario	Valor de p de FET	OR [IC95%]
Controles	1813	11	1824	0,003	-	Ref
CM solo	685	19	704	0,013	$4,5 \cdot 10^{-5}$	4,57 [2,05-10,68]
Familiar	415	7	422	0,008	0,06	2,78 [0,91-7,90]
Varios melanomas primarios (MPM)	232	10	242	0,021	$4,1 \cdot 10^{-5}$	7,10 [2,67-18,62]
Melanoma nodular	38	2	40	0,025	0,029	8,67 [0,90-41,70]

20 Prueba de homogeneidad de las frecuencias alélicas entre las 3 categorías de melanomas solos (familiar, MPM, nodular): $p = 0,065$ (prueba exacta); si la prueba de homogeneidad se hace comparando el familiar frente al MPM: $p = 0,072$ (prueba exacta).

Ejemplo 3

Consecuencias funcionales de la mutación p.E318K del MITF

25 Esta mutación E318K se sitúa en uno de los dos sitios de sumoilación de la proteína (motivo WKXE, 2 sitios K182 y K316). Los inventores han mostrado una disminución de la sumoilación del MITF en presencia de la mutación E318K (figura 3).

Más en concreto, los inventores han generado por mutagénesis dirigida la variante E318K. Además, han preparado del mismo modo la variante K182R y un doble mutante K182R:E318K.

30 Los experimentos de transferencia Western con extractos totales con un anticuerpo anti-MITF, después de la coexpresión de His-SUMO-1 con el MITF silvestre han revelado la presencia de una banda de 120 kDa y un doblete a aproximadamente 90 kDa, lo que sugiere que el MITF experimentó una sumoilación que aumentó su masa molecular (figura 4A). Aunque la adición exógena de proteínas SUMO hizo aumentar la cantidad global de

sumoilación del MITF, la transferencia Western ha demostrado que el MITF también está sumoilado en las condiciones iniciales que muestran el doblete a 90 kDa, lo que excluye también un efecto inespecífico de la sobreexpresión de SUMO. La mutación K182R ha conducido a la desaparición completa de la forma del MITF de masa molecular más elevada, pero no afecta prácticamente a la banda de 90 kDa. Cuando el codón 318 ha sido mutado por una lisina, los inventores han observado una disminución importante de la intensidad de todas las bandas de alto peso molecular del MITF. Finalmente, no se ha podido observar ninguna forma de alto peso molecular del MITF cuando se ha utilizado el doble mutante. Se han hecho observaciones similares con una coexpresión de HA-SUMO-2 (figura 4B), lo que demuestra que el MITF silvestre ha sido modificado por SUMO1 o SUMO2, y que la mutación E318K afecta al mismo tiempo a las modificaciones por SUMO1 y SUMO2. Para confirmar la conjugación de SUMO-1 al MITF, el plásmido His-SUMO-1 ha sido transfectado solo o con las construcciones del *MITF*. A continuación, las proteínas que contienen His-SUMO-1 se han purificado sobre una columna Ni-TFA. En las células transfectadas con el *MITF* silvestre, la transferencia Western con un anti-MITF ha revelado formas de MITF sumoiladas que migran a aproximadamente 90 y 120 kDa (figura 4C). La mutación K182R afecta principalmente a la forma sumoilada del MITF a 120 kDa, mientras que no se ha podido observar ninguna forma sumoilada del MITF con E318K ni con el doble mutante. En conjunto, estos resultados demuestran que el codón 316 es un sitio aceptor importante del MITF para la proteína SUMO y que la mutación E318K disminuye drásticamente la sumoilación del MITF.

Ejemplo 4

La mutación E318K podría cambiar la localización del MITF y alterar su actividad transcripcional

La sumoilación orquesta muchos procesos celulares en parte por el control de la transducción de señales nucleocitoplasmáticas y de la transcripción. Los inventores han examinado si el mutante E318K cuya sumoilación es menor podía alterar la localización celular del MITF (figura 5A). La tinción por inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-MITF ha mostrado que el mutante E318K, y también K182R y K182R:E318K, se detectaban en el núcleo de las células del melanoma, lo cual es coherente con la localización nuclear de la forma silvestre del MITF. No obstante, los experimentos de inmunohistoquímica han permitido mostrar, con muestras de melanoma y de cáncer de riñón, una marcación nuclear y citoplasmática para los mutantes E318K (figura 5B).

Tipo de marcación	Nuclear	Nuclear + citoplasmática	Ninguna
Melanoma de control	8/9	1/9	0/9
Melanoma portador de E318K	0/8	8/8	0/8
Cáncer de riñón de control	0/6	0/6	6/6
Cáncer de riñón portador de E318K	0/6	2/6	4/6

De igual forma, los inventores han explorado el posible efecto de la sustitución E318K sobre la actividad transcripcional del *MITF*. Han comparado la actividad de la forma silvestre frente al mutante E318K con un delator sintético que contiene 3 copias de una caja M insertada en un promotor mínimo de SV40. El mutante E318K ha mostrado una actividad transcripcional de 2 a 3 veces más elevada que la de la forma silvestre (figura 5C). El doble mutante seguía siendo más eficaz que el mutante E318K, mientras que el mutante simple K182R mostraba una actividad comparable a la de la forma silvestre. Estos resultados indican que la sumoilación disminuye la actividad transcripcional del *MITF*. A continuación, los inventores han verificado el efecto de la mutación E318K sobre los promotores fisiológicos. Se han concentrado en *MET* y *HIF1A*, dos genes diana de MITF implicados en la oncogenia de los melanocitos y del riñón. La forma silvestre del MITF y el mutante E318K mostraron actividades transcripcionales similares con el promotor de *MET* (figura 2), mientras que el mutante E318K presentó una actividad transcripcional más elevada con el promotor de *HIF1A* que la forma silvestre. Por consiguiente, la mutación p.E318K puede ejercer su efecto oncogénico mediante una regulación transcripcional exacerbada de *HIF1A*.

Ejemplo 5

La mutación E318K confiere un fenotipo celular menos diferenciado y más proliferativo

La producción de pigmentos es un rasgo de la diferenciación de los melanocitos caracterizada por un menor crecimiento, mientras que las células poco pigmentadas se correlacionan estrechamente con fenotipos proliferativos y menos diferenciados. Además, la hipoxia y el *HIF1A* mantienen la supervivencia, la proliferación y la transformación de los melanocitos, y la progresión de los melanomas. Por consiguiente, los inventores han encontrado que los melanocitos aislados de las biopsias de piel de un paciente que lleva la mutación germinal

estaban menos pigmentados que los melanocitos de dos donantes sanos que no llevaban la mutación, los tres de raza blanca (figura 6). La transcripción del *MITF* se modifica por dos vías de señalización por receptores, que incluyen el receptor de la melanocortina 1 (MC1R). Finalmente, por comparación con el *MITF* silvestre, la expresión de E318K estimulaba el crecimiento de los melanocitos inmortalizados (figura 7A, Melan-a), de las células de los melanomas (figura 7B, A375) y también de las células de carcinoma de riñón deficiente en VHL (figura 7C, RCC4). En conjunto, los datos sugieren que el mutante E318K del *MITF* confiere una ventaja de crecimiento constitutiva.

Materiales y métodos

Melarisk es una colección única de familias propensas a los melanomas (MELARISK) que se inició en 1985 en el Instituto Gustave Roussy (Pr AVRIL) y el INSERM (Florence Demenais, U946) con la participación de dermatólogos (en particular, desde 2005 el CHU Cochin, Pr AVRIL y los Geriátricos Civiles de Lyon, Pr THOMAS) y de oncogenéticos. El material biológico se conserva en el Biobanco de propensión al cáncer del IGR (sangre, linfocitos congelados, líneas celulares linfoblásticas establecidas por Généthon, ADN). Los datos familiares, demográficos, clínicos y de factor de riesgo de melanoma se han recogido desde hace varios años hasta la actualidad y se han almacenado en una base de datos MySQL en la unidad U946 del INSERM.

15 Secuenciación directa del *MITF*

Los cebadores utilizados para la secuenciación del *MITF* se muestran en la tabla que viene a continuación. El protocolo de amplificación consistía en 35 ciclos con etapas de temperatura a 94 °C, 60 °C y 72 °C de 30 s cada una.

Los productos de PCR se han secuenciado con la técnica de «Big Dye Terminator», versión 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, California) en secuenciadores Genetic Analyzer 3730 ABI PRISM® (Applied Biosystems, Foster City, California).

Tabla. Secuencia de los cebadores para el gen *MITF*

Fragmento amplificado	Secuencia sentido 5'>3'	Secuencia antisentido 5'>3'	Tamaño del producto (pb)
Exón 1a_part1	SEQ ID n.º 1	SEQ ID n.º 2	377
Exón 1a_part2	SEQ ID n.º 3	SEQ ID n.º 4	394
Exón 1b	SEQ ID n.º 5	SEQ ID n.º 6	298
Exón 1e	SEQ ID n.º 7	SEQ ID n.º 8	232
Exón 2/Exón 1c	SEQ ID n.º 9	SEQ ID n.º 10	396
Exón 1 (M)	SEQ ID n.º 11	SEQ ID n.º 12	389
Exón 2	SEQ ID n.º 13	SEQ ID n.º 14	426
Exón 3	SEQ ID n.º 15	SEQ ID n.º 16	271
Exón 4	SEQ ID n.º 17	SEQ ID n.º 18	257
Exón 5	SEQ ID n.º 19	SEQ ID n.º 20	447
Exón 6a/6b	SEQ ID n.º 21	SEQ ID n.º 22	280
Exón 7	SEQ ID n.º 23	SEQ ID n.º 24	320
Exón 8	SEQ ID n.º 25	SEQ ID n.º 26	563
Exón 9	SEQ ID n.º 27	SEQ ID n.º 28	544

Genotipado de la mutación E318K del *MITF* por PCR con una sonda MGB Taqman

Las reacciones de PCR se han hecho con 10 ng de ADN genómico en presencia de 0,2 $\mu\text{mol/l}$ de sondas MGB TaqMan bien (5'-VIC-ATC AAG CAA GAA CCC G-3', SEQ ID n.º 29) que se aparea perfectamente con la secuencia del *MITF* silvestre o bien (5'-FAM-CAA GCA AAA ACC CG-3', SEQ ID n.º 30) que se aparea perfectamente con la secuencia del *MITF* que codifica la mutación E318K. La concentración final de los otros reactivos han sido las siguientes: mezcla Universal Master a 1X (Applied), 0,4 $\mu\text{mol/l}$ del cebador sentido (5'-TGCTCTCCAGATTGGTGAATCG -3', SEQ ID n.º 31), 0,4 $\mu\text{mol/l}$ de cebador antisentido (5'-GGTCTTGGCTGCAGTTCTCAA-3', SEQ ID n.º 32). El tamaño del amplicón de la PCR es de 67 pb. El ciclado de la PCR se ha hecho en un termociclador 2720 ABI™ como sigue: 95 °C durante 15 min; 30 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min. La discriminación alélica se ha hecho mediante la medición final de la fluorescencia en un sistema rápido de PCR en tiempo real 7900HT de ABI™ y se ha analizado con el programa informático SDS v2.3 de ABI™. Las muestras de ADN silvestre o bien de E318K se han incluido en cada experimento de genotipado como controles. Las muestras mutadas y genotipadas se han verificado por secuenciación directa con el protocolo y los cebadores que se detallan a continuación para el exón 9 del *MITF*.

Plásmidos

15 La construcción pCDNA3-Mi de la forma M del *MITF* se ha descrito anteriormente (7). Las mutaciones del *MITF*, K182R y/o E318K, se han generado con el procedimiento QuickChange (Stratagene) con los cebadores sentido siguientes y sus complementos antisentido: Mi-K182R 5'-cttccaacataagaaggagctcacagc-3' (SEQ ID n.º 33); MI-E318K 5'-ggatcatcaagcaaaaaccagtcttgag-3' (SEQ ID n.º 34). La presencia de las mutaciones se ha confirmado por secuenciación.

20 His-SUMO1 e His-HA-SUMO2 fueron cedidos por M. A. Dejean y se han descrito en el artículo siguiente (8).

Cotransfecciones e inmunodetección

25 Las células HEK293 cultivadas en placas de 6 pocillos (10^4 células/pocillo) se han transfectado con los plásmidos indicados (2 μg de ADN total/pocillo) y del FuGENE 6™ (Roche Applied Science). Al cabo de 48 horas, se han lavado las células con PBS, luego se han lisado a 95 °C en tampón de carga a 1X (41,6 mM de Tris, pH 6,8, 1,5% de SDS, 6,7% de glicerol) y se han llevado a ebullición durante 5 minutos más.

Las proteínas se han separado por electroforesis en un gel al 10% de SDS-poliacrilamida y se han transferido a membranas de PVDF. Las proteínas se han detectado con ECL (Amersham) y los anticuerpos anti-MITF (Abcam), contra la etiqueta HA (Abcam), anti-SUMO1 (Santa Cruz Biotech) o anti-ERK2 (Santa Cruz Biotech).

Pruebas de las medidas de expresión de los indicadores

30 Las células humanas 501mel y de ratón B16 se han repartido en placas de 24 pocillos ($25 \cdot 10^3$ células/pocillo) y al día siguiente, las células se han transfectado de manera transitoria con 0,3 μg del plásmido indicador (pHIF1 α y pMet), 0,05 μg de plásmidos que codifican MIT o de pCDNA2 vacío, 2 μl del reactivo lipofectamina (Invitrogen) y 0,05 μg de pCMV β Ga1 para controlar la variabilidad de la eficacia de la transfección. Al cabo de 48 horas, se lisaron las células y se les analizó la actividad luciferasa y β -galactosidasa. Las transfecciones se han repetido al menos tres veces.

Inmunofluorescencia

40 Las células HEK293 se han sembrado sobre cubreobjetos de cristal ($100 \cdot 10^3$ células) en una placa de 6 pocillos y se han transfectado con 3 μg de plásmidos con MITF o pCDNA3 vacío utilizando 10 μl de lipofectamina. Al cabo de 48 h, las células se han fijado durante 10 minutos con paraformaldehído al 4% en PBS, se han lavado con PBS y se han permeabilizado durante 2 min con Triton X-100 al 0,1%/seroalbúmina bovina (SAB) al 1%. A continuación, se han lavado las muestras una vez con PBS y se han tratado con NH_4Cl a 50 mM durante 2 min, luego se han lavado 3 veces en PBS y se han teñido durante 1 h con un anticuerpo anti-MITF (Abcam) en SAB al 1%/PBS. Después se han lavado las muestras 3 veces con PBS durante 5 min y se han teñido durante 1 h con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con Alexa-488 (Molecular Probes) en SAB al 1%. Las células se han lavado una vez en PBS, se les ha realizado una tinción de contraste con 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI), se han lavado 3 veces en PBS y se han montado con Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham AL). Se han examinado las células con un microscopio Zeiss Axiophot equipado con una iluminación epifluorescente.

Determinación del contenido de melanina

50 Se han sedimentado aproximadamente $6 \cdot 10^6$ melanocitos por centrifugación a 1000xg durante 5 min y se han lavado dos veces con un tampón de fosfato. Una parte de los precipitados se ha solubilizado en NaOH a 0,5 M durante 1 h a 80 °C y se ha medido la densidad óptica a 405 nm. La otra parte se ha utilizado para determinar el contenido de proteínas mediante una prueba BCA™ (Pierce). El contenido de melanina ha sido corregido por la concentración de proteínas y se ha expresado como el porcentaje de las células de control (100%).

Prueba de formación de colonias

Las células de melanoma humano A375 y de carcinoma renal humano RCC4 (80.000 por pocillo) se han transfectado con un total por pocillo de 3 µg de ADN (*MITF* silvestre o E318K) que incluye el 10% de pBABE-puro mediante el uso de Fugene (Roche). Se ha añadido puromicina (1 µg/ml) al medio 48 h después de la transfección.

- 5 Al cabo de 14 días, las células se han fijado, se han teñido con violeta de genciana al 0,4% y se han fotografiado las placas. De igual forma, las células se han destefido con ácido acético al 10% en PBS y se ha medido la absorbancia a 610 nm para reflejar el número de células.

Inmunohistoquímica

Después del desparafinado de los portaobjetos y de haber desenmascarado los antígenos con calor en una solución de Antigen Unmasking Solution (Vector Laboratories), los cortes se han permeabilizado (0,3% de Triton/PBS durante 15 min) y luego se han enjuagado rápidamente con PBS. Después de haber bloqueado las peroxidases endógenas, los cortes se han saturado durante 30 minutos en una solución de PBS/SAB al 1%/suero de cabra al 5%. A continuación, se han incubado toda una noche a 4 °C con el primer anticuerpo anti-MITF del clon C5 (dilución 1/10 o 1/100) en una solución de PBS/SAB al 1%. Después del enjuague en PBS, los cortes se han incubado con el 2º anticuerpo biotinilado en PBS/SAB al 1% a temperatura ambiente durante 1 h. A continuación, los cortes se han enjuagado en PBS y luego se han incubado en una solución de avidina/biotina HRP (kit ABC Elite, Vector Laboratories). Después del enjuague en PBS, las placas se han revelado en presencia de un sustrato de la peroxidasa (kit VIP, Vector Laboratories). Los portaobjetos se han montado finalmente con Mountex (Cell Path).

20 **Referencias**

1. Levy,C., et al. (2006) *Trends Mol.Med.*, **12**, 406-414.
2. Garraway,L.A., et al. (2005) *Nature*, **436**, 117-122.
3. Kido,K., et al. (2009) *Cancer Sci.* **100**, 1863-1869.
4. Larribere, L., et al. (2005) *Genes Dev.* **19**, 1980-1985.
5. Chung, S.Y., et al. (2009) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 1704-1710.
6. Halder, B., et al. (2009) *Carcinogenesis* **29**, 129-138.
7. Bertolotto C, et al. (1998) *J Cell Biol*;**142**:827-35.
8. Bischof O, et al. (2006) *Mol Cell*;**22**:783-94.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Institut Gustave Roussy et al

<120> Marcador para la predisposición al cáncer

5 <130> B987PC

<160> 40

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

10 <211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

15 <223> cebador

<400> 1

cttgaagcaa gtggggagag 20

20 <210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> secuencia artificial

25 <220>

<223> cebador

<400> 2

ccactgctgg aaagtgagaa c 21

30

<210> 3

<211> 18

<212> ADN

<213> secuencia artificial

35

<220>

<223> cebador

ES 2 534 755 T3

<400> 3
ccgggccgaa ctacagat 18

5 <210> 4
<211> 19
<212> ADN
<213> secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador

<400> 4
cagagtggca gacgcagtg 19

15
<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

20
<220>
<223> cebador

<400> 5
25 tcctctcctt ttgcttctga 20

<210> 6
<211> 22
<212> ADN

30 <213> secuencia artificial

<220>
<223> cebador

35 <400> 6
tgaacaagaa ccaagatt ca 22

<210> 7

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

5

<220>

<223> cebador

<400> 7

10 cacagccagt gccagaacta 20

<210> 8

<211> 22

<212> ADN

15 <213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

20 <400> 8

ccaataaac ccttctctc ct 22

<210> 9

<211> 20

25 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

30

<400> 9

ggtgcaattt aggatacccc 20

<210> 10

35 <211> 21

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

5 <400> 10

cacctagcaa atggaaaatg g 21

<210> 11

<211> 20

10 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

15

<400> 11

ggcccttatg tgaacgttt 20

<210> 12

20 <211> 22

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

25 <223> cebador

<400> 12

tggcatcaaa taataaacag ca 22

30 <210> 13

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

35 <220>

<223> cebador

ES 2 534 755 T3

<400> 13

ttgtgcctg aaggaagagc 20

<210> 14

5 <211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> cebador

<400> 14

caaaggctgg taaatgtggc 20

15 <210> 15

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

20 <220>

<223> cebador

<400> 15

gttcaccttg ttgctgtgcc 20

25

<210> 16

<211> 23

<212> ADN

<213> secuencia artificial

30

<220>

<223> cebador

<400> 16

35 gcttaagttt tcaggaaggt gtg 23

<210> 17

ES 2 534 755 T3

<211> 21

<212> ADN

<213> secuencia artificial

5 <220>

<223> cebador

<400> 17

aaagaccatt atgcttgg g 21

10

<210> 18

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

15

<220>

<223> cebador

<400> 18

20 aaaagaaccc tggaacacc 20

<210> 19

<211> 27

<212> ADN

25 <213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

30 <400> 19

ggagatcctg tacctctt ttaatac 27

<210> 20

<211> 22

35 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 20

5 tgtttaacc actgcagaga cc 22

<210> 21

<211> 24

<212> ADN

10 <213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

15 <400> 21

caaataagct tctgtatgtt tggg 24

<210> 22

<211> 22

20 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

25

<400> 22

cagctgtagg aatcaactct cc 22

<210> 23

30 <211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

35 <223> cebador

<400> 23

ES 2 534 755 T3

aggttcaggt tccgtgtc 20

<210> 24

5 <211> 20
<212> ADN
<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> cebador

<400> 24

tagaaccaaa gggagagggg 20

15 <210> 25
<211> 18
<212> ADN
<213> secuencia artificial

20 <220>
<223> cebador

<400> 25

tacacggctt ggggtgtg 18

25 <210> 26
<211> 21
<212> ADN
<213> secuencia artificial

30 <220>
<223> cebador

<400> 26

35 catgtccaag aatgactgtg g 21

<210> 27

<211> 23

<212> ADN

<213> secuencia artificial

5 <220>

<223> cebador

<400> 27

gcttaaaagt cctctgtgct ctg 23

10

<210> 28

<211> 22

<212> ADN

<213> secuencia artificial

15

<220>

<223> cebador

<400> 28

20 caagaaaacc ccttcaggta ag 22

<210> 29

<211> 16

<212> ADN

25 <213> secuencia artificial

<220>

<223> sonda

30 <400> 29

atcaagcaag aaccgg 16

<210> 30

<211> 14

35 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> sonda

<400> 30

5 caagcaaaaa cccg 14

<210> 31

<211> 23

<212> ADN

10 <213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

15 <400> 31

tgctctccag atttggtgaa tcg 23

<210> 32

<211> 21

20 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

25

<400> 32

ggtcttggct gcagttctca a 21

<210> 33

30 <211> 29

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

35 <223> cebador

<400> 33

ctccaaca taagaagga gctcacagc 29

<210> 34

5 <211> 29

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

10 <223> cebador

<400> 34

ggatcatcaa gcaaaaacca gttcttgag 29

15 <210> 35

<211> 520

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <220>

<221> SITIO

<222> (289) .. (289)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

25 <220>

<221> SITIO

<222> (291)..(291)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

30 <220>

<221> SITIO

<222> (417)..(417)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

35 <220>

<221> SITIO

<222> (419)..(419)

ES 2 534 755 T3

Lys Ser Ser Ser Ser Ala Glu His Pro Gly Ala Ser Lys Pro Pro Ile
 35 40 45
 Ser Ser Ser Ser Met Thr Ser Arg Ile Leu Leu Arg Gln Gln Leu Met
 50 55 60
 Arg Glu Gln Met Gln Glu Gln Glu Arg Arg Glu Gln Gln Gln Lys Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Ala Gln Phe Met Gln Gln Arg Val Pro Val Ser Gln Thr Pro
 85 90 95
 Ala Ile Asn Val Ser Val Pro Thr Thr Leu Pro Ser Ala Thr Gln Val
 100 105 110
 Pro Met Glu Val Leu Lys Val Gln Thr His Leu Glu Asn Pro Thr Lys
 115 120 125
 Tyr His Ile Gln Gln Ala Gln Arg Gln Gln Val Lys Gln Tyr Leu Ser
 130 135 140
 Thr Thr Leu Ala Asn Lys His Ala Asn Gln Val Leu Ser Leu Pro Cys
 145 150 155 160
 Pro Asn Gln Pro Gly Asp His Val Met Pro Pro Val Pro Gly Ser Ser
 165 170 175
 Ala Pro Asn Ser Pro Met Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn Cys Glu
 180 185 190
 Lys Glu Gly Phe Tyr Lys Phe Glu Glu Gln Asn Arg Ala Glu Ser Glu
 195 200 205
 Cys Pro Gly Met Asn Thr His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln Met Asp
 210 215 220
 Asp Val Ile Asp Asp Ile Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn Glu Glu
 225 230 235 240
 Ile Leu Gly Leu Met Asp Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr Leu Pro
 245 250 255
 Val Ser Gly Asn Leu Ile Asp Leu Tyr Gly Asn Gln Gly Leu Pro Pro
 260 265 270
 Pro Gly Leu Thr Ile Ser Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro Asn Ile
 275 280 285

ES 2 534 755 T3

Xaa Arg Xaa Leu Thr Glu Ser Glu Ala Arg Ala Leu Ala Lys Glu Arg
290 295 300

Gln Lys Lys Asp Asn His Asn Leu Ile Glu Arg Arg Arg Arg Phe Asn
305 310 315 320

Ile Asn Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly Thr Leu Ile Pro Lys Ser Asn
325 330 335

Asp Pro Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly Thr Ile Leu Lys Ala Ser Val
340 345 350

Asp Tyr Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu Gln Gln Arg Ala Lys Glu Leu
355 360 365

Glu Asn Arg Gln Lys Lys Leu Glu His Ala Asn Arg His Leu Leu Leu
370 375 380

Arg Ile Gln Glu Leu Glu Met Gln Ala Arg Ala His Gly Leu Ser Leu
385 390 395 400

Ile Pro Ser Thr Gly Leu Cys Ser Pro Asp Leu Val Asn Arg Ile Ile
405 410 415

Xaa Gln Xaa Pro Val Leu Glu Asn Cys Ser Gln Asp Leu Leu Gln His
420 425 430

His Ala Asp Leu Thr Cys Thr Thr Thr Leu Asp Leu Thr Asp Gly Thr
435 440 445

Ile Thr Phe Asn Asn Asn Leu Gly Thr Gly Thr Glu Ala Asn Gln Ala
450 455 460

Tyr Ser Val Pro Thr Lys Met Gly Ser Lys Leu Glu Asp Ile Leu Met
465 470 475 480

Asp Asp Thr Leu Ser Pro Val Gly Val Thr Asp Pro Leu Leu Ser Ser
485 490 495

Val Ser Pro Gly Ala Ser Lys Thr Ser Ser Arg Arg Ser Ser Met Ser
500 505 510

Met Glu Glu Thr Glu His Thr Cys
515 520

<210> 36

<211> 504

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SITIO

<222> (273)..(273)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

5 <220>

<221> SITIO

<222> (275)..(275)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

10 <220>

<221> SITIO

<222> (401)..(401)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

15 <220>

<221> SITIO

<222> (403)..(403)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

20 <400> 36

ES 2 534 755 T3

Met Glu Ala Leu Arg Val Gln Met Phe Met Pro Cys Ser Phe Glu Ser
 1 5 10 15

Leu Tyr Leu Ser Ser Ala Glu His Pro Gly Ala Ser Lys Pro Pro Ile
 20 25 30

Ser Ser Ser Ser Met Thr Ser Arg Ile Leu Leu Arg Gln Gln Leu Met
 35 40 45

Arg Glu Gln Met Gln Glu Gln Glu Arg Arg Glu Gln Gln Gln Lys Leu
 50 55 60

Gln Ala Ala Gln Phe Met Gln Gln Arg Val Pro Val Ser Gln Thr Pro
 65 70 75 80

Ala Ile Asn Val Ser Val Pro Thr Thr Leu Pro Ser Ala Thr Gln Val
 85 90 95

Pro Met Glu Val Leu Lys Val Gln Thr His Leu Glu Asn Pro Thr Lys
 100 105 110

Tyr His Ile Gln Gln Ala Gln Arg Gln Gln Val Lys Gln Tyr Leu Ser
 115 120 125

Thr Thr Leu Ala Asn Lys His Ala Asn Gln Val Leu Ser Leu Pro Cys
 130 135 140

Pro Asn Gln Pro Gly Asp His Val Met Pro Pro Val Pro Gly Ser Ser
 145 150 155 160

Ala Pro Asn Ser Pro Met Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn Cys Glu
 165 170 175

ES 2 534 755 T3

Lys Glu Gly Phe Tyr Lys Phe Glu Glu Gln Asn Arg Ala Glu Ser Glu
180 185 190

Cys Pro Gly Met Asn Thr His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln Met Asp
195 200 205

Asp Val Ile Asp Asp Ile Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn Glu Glu
210 215 220

Ile Leu Gly Leu Met Asp Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr Leu Pro
225 230 235 240

Val Ser Gly Asn Leu Ile Asp Leu Tyr Gly Asn Gln Gly Leu Pro Pro
245 250 255

Pro Gly Leu Thr Ile Ser Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro Asn Ile
260 265 270

Xaa Arg Xaa Leu Thr Glu Ser Glu Ala Arg Ala Leu Ala Lys Glu Arg
275 280 285

Gln Lys Lys Asp Asn His Asn Leu Ile Glu Arg Arg Arg Arg Phe Asn
290 295 300

Ile Asn Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly Thr Leu Ile Pro Lys Ser Asn
305 310 315 320

Asp Pro Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly Thr Ile Leu Lys Ala Ser Val
325 330 335

Asp Tyr Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu Gln Gln Arg Ala Lys Glu Leu
340 345 350

Glu Asn Arg Gln Lys Lys Leu Glu His Ala Asn Arg His Leu Leu Leu
355 360 365

Arg Ile Gln Glu Leu Glu Met Gln Ala Arg Ala His Gly Leu Ser Leu
370 375 380

Ile Pro Ser Thr Gly Leu Cys Ser Pro Asp Leu Val Asn Arg Ile Ile
385 390 395 400

Xaa Gln Xaa Pro Val Leu Glu Asn Cys Ser Gln Asp Leu Leu Gln His
405 410 415

His Ala Asp Leu Thr Cys Thr Thr Thr Leu Asp Leu Thr Asp Gly Thr
420 425 430

ES 2 534 755 T3

Ile Thr Phe Asn Asn Asn Leu Gly Thr Gly Thr Glu Ala Asn Gln Ala
 435 440 445

Tyr Ser Val Pro Thr Lys Met Gly Ser Lys Leu Glu Asp Ile Leu Met
 450 455 460

Asp Asp Thr Leu Ser Pro Val Gly Val Thr Asp Pro Leu Leu Ser Ser
 465 470 475 480

Val Ser Pro Gly Ala Ser Lys Thr Ser Ser Arg Arg Ser Ser Met Ser
 485 490 495

Met Glu Glu Thr Glu His Thr Cys
 500

<210> 37

<211> 519

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SITIO

10 <222> (288)..(288)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> SITIO

15 <222> (290)..(290)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> SITIO

20 <222> (416)..(416)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> SITIO

25 <222> (418)..(418)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<400> 37

ES 2 534 755 T3

Met Gly His Leu Glu Asn Thr Ser Val Val Phe Pro Arg Ala Ile Phe
1 5 10 15

Ser Leu Cys Glu Lys Glu Thr Arg Lys Leu Thr Leu Cys Leu Phe Ser
20 25 30

Arg Ser Ser Ser Ala Glu His Pro Gly Ala Ser Lys Pro Pro Ile Ser
35 40 45

Ser Ser Ser Met Thr Ser Arg Ile Leu Leu Arg Gln Gln Leu Met Arg
50 55 60

ES 2 534 755 T3

Glu Gln Met Gln Glu Gln Glu Arg Arg Glu Gln Gln Gln Lys Leu Gln
 65 70 75 80
 Ala Ala Gln Phe Met Gln Gln Arg Val Pro Val Ser Gln Thr Pro Ala
 85 90 95
 Ile Asn Val Ser Val Pro Thr Thr Leu Pro Ser Ala Thr Gln Val Pro
 100 105 110
 Met Glu Val Leu Lys Val Gln Thr His Leu Glu Asn Pro Thr Lys Tyr
 115 120 125
 His Ile Gln Gln Ala Gln Arg Gln Gln Val Lys Gln Tyr Leu Ser Thr
 130 135 140
 Thr Leu Ala Asn Lys His Ala Asn Gln Val Leu Ser Leu Pro Cys Pro
 145 150 155 160
 Asn Gln Pro Gly Asp His Val Met Pro Pro Val Pro Gly Ser Ser Ala
 165 170 175
 Pro Asn Ser Pro Met Ala Met Leu Thr Leu Asn Ser Asn Cys Glu Lys
 180 185 190
 Glu Gly Phe Tyr Lys Phe Glu Glu Gln Asn Arg Ala Glu Ser Glu Cys
 195 200 205
 Pro Gly Met Asn Thr His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln Met Asp Asp
 210 215 220
 Val Ile Asp Asp Ile Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn Glu Glu Ile
 225 230 235 240
 Leu Gly Leu Met Asp Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr Leu Pro Val
 245 250 255
 Ser Gly Asn Leu Ile Asp Leu Tyr Gly Asn Gln Gly Leu Pro Pro Pro
 260 265 270
 Gly Leu Thr Ile Ser Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro Asn Ile Xaa
 275 280 285
 Arg Xaa Leu Thr Glu Ser Glu Ala Arg Ala Leu Ala Lys Glu Arg Gln
 290 295 300
 Lys Lys Asp Asn His Asn Leu Ile Glu Arg Arg Arg Arg Phe Asn Ile
 305 310 315 320
 Asn Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly Thr Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp

<220>

<221> SITIO

<222> (184)..(184)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

5

<220>

<221> SITIO

<222> (316)..(316)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

10

<220>

<221> SITIO

<222> (318)..(318)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

15

<400> 38

ES 2 534 755 T3

Met Leu Glu Met Leu Glu Tyr Asn His Tyr Gln Val Gln Thr His Leu
 1 5 10 15

Glu Asn Pro Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala Gln Arg Gln Gln Val
 20 25 30

Lys Gln Tyr Leu Ser Thr Thr Leu Ala Asn Lys His Ala Asn Gln Val
 35 40 45

Leu Ser Leu Pro Cys Pro Asn Gln Pro Gly Asp His Val Met Pro Pro
 50 55 60

Val Pro Gly Ser Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met Ala Met Leu Thr Leu
 65 70 75 80

Asn Ser Asn Cys Glu Lys Glu Gly Phe Tyr Lys Phe Glu Glu Gln Asn
 85 90 95

Arg Ala Glu Ser Glu Cys Pro Gly Met Asn Thr His Ser Arg Ala Ser
 100 105 110

Cys Met Gln Met Asp Asp Val Ile Asp Asp Ile Ile Ser Leu Glu Ser
 115 120 125

Ser Tyr Asn Glu Glu Ile Leu Gly Leu Met Asp Pro Ala Leu Gln Met
 130 135 140

Ala Asn Thr Leu Pro Val Ser Gly Asn Leu Ile Asp Leu Tyr Gly Asn
 145 150 155 160

Gln Gly Leu Pro Pro Pro Gly Leu Thr Ile Ser Asn Ser Cys Pro Ala
 165 170 175

Asn Leu Pro Asn Ile Xaa Arg Xaa Leu Thr Ala Cys Ile Phe Pro Thr
 180 185 190

Glu Ser Glu Ala Arg Ala Leu Ala Lys Glu Arg Gln Lys Lys Asp Asn
 195 200 205

ES 2 534 755 T3

His Asn Leu Ile Glu Arg Arg Arg Arg Phe Asn Ile Asn Asp Arg Ile
 210 215 220

Lys Glu Leu Gly Thr Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp Pro Asp Met Arg
 225 230 235 240

Trp Asn Lys Gly Thr Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp Tyr Ile Arg Lys
 245 250 255

Leu Gln Arg Glu Gln Gln Arg Ala Lys Glu Leu Glu Asn Arg Gln Lys
 260 265 270

Lys Leu Glu His Ala Asn Arg His Leu Leu Leu Arg Ile Gln Glu Leu
 275 280 285

Glu Met Gln Ala Arg Ala His Gly Leu Ser Leu Ile Pro Ser Thr Gly
 290 295 300

Leu Cys Ser Pro Asp Leu Val Asn Arg Ile Ile Xaa Gln Xaa Pro Val
 305 310 315 320

Leu Glu Asn Cys Ser Gln Asp Leu Leu Gln His His Ala Asp Leu Thr
 325 330 335

Cys Thr Thr Thr Leu Asp Leu Thr Asp Gly Thr Ile Thr Phe Asn Asn
 340 345 350

Asn Leu Gly Thr Gly Thr Glu Ala Asn Gln Ala Tyr Ser Val Pro Thr
 355 360 365

Lys Met Gly Ser Lys Leu Glu Asp Ile Leu Met Asp Asp Thr Leu Ser
 370 375 380

Pro Val Gly Val Thr Asp Pro Leu Leu Ser Ser Val Ser Pro Gly Ala
 385 390 395 400

Ser Lys Thr Ser Ser Arg Arg Ser Ser Met Ser Met Glu Glu Thr Glu
 405 410 415

His Thr Cys

<210> 39

<211> 413

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SITIO

10 <222> (182)..(182)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> SITIO

5 <222> (184)..(184)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> SITIO

10 <222> (310)..(310)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<220>

<221> SITIO

15 <222> (312)..(312)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

<400> 39

ES 2 534 755 T3

Met Leu Glu Met Leu Glu Tyr Asn His Tyr Gln Val Gln Thr His Leu
 1 5 10 15

Glu Asn Pro Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala Gln Arg Gln Gln Val
 20 25 30

Lys Gln Tyr Leu Ser Thr Thr Leu Ala Asn Lys His Ala Asn Gln Val
 35 40 45

Leu Ser Leu Pro Cys Pro Asn Gln Pro Gly Asp His Val Met Pro Pro
 50 55 60

Val Pro Gly Ser Ser Ala Pro Asn Ser Pro Met Ala Met Leu Thr Leu
 65 70 75 80

Asn Ser Asn Cys Glu Lys Glu Gly Phe Tyr Lys Phe Glu Glu Gln Asn
 85 90 95

Arg Ala Glu Ser Glu Cys Pro Gly Met Asn Thr His Ser Arg Ala Ser
 100 105 110

Cys Met Gln Met Asp Asp Val Ile Asp Asp Ile Ile Ser Leu Glu Ser
 115 120 125

Ser Tyr Asn Glu Glu Ile Leu Gly Leu Met Asp Pro Ala Leu Gln Met
 130 135 140

Ala Asn Thr Leu Pro Val Ser Gly Asn Leu Ile Asp Leu Tyr Gly Asn
 145 150 155 160

Gln Gly Leu Pro Pro Pro Gly Leu Thr Ile Ser Asn Ser Cys Pro Ala
 165 170 175

Asn Leu Pro Asn Ile Xaa Arg Xaa Leu Thr Glu Ser Glu Ala Arg Ala

ES 2 534 755 T3

180 185 190

Leu Ala Lys Glu Arg Gln Lys Lys Asp Asn His Asn Leu Ile Glu Arg
195 200 205

Arg Arg Arg Phe Asn Ile Asn Asp Arg Ile Lys Glu Leu Gly Thr Leu
210 215 220

Ile Pro Lys Ser Asn Asp Pro Asp Met Arg Trp Asn Lys Gly Thr Ile
225 230 235 240

Leu Lys Ala Ser Val Asp Tyr Ile Arg Lys Leu Gln Arg Glu Gln Gln
245 250 255

Arg Ala Lys Glu Leu Glu Asn Arg Gln Lys Lys Leu Glu His Ala Asn
260 265 270

Arg His Leu Leu Leu Arg Ile Gln Glu Leu Glu Met Gln Ala Arg Ala
275 280 285

His Gly Leu Ser Leu Ile Pro Ser Thr Gly Leu Cys Ser Pro Asp Leu
290 295 300

Val Asn Arg Ile Ile Xaa Gln Xaa Pro Val Leu Glu Asn Cys Ser Gln
305 310 315 320

Asp Leu Leu Gln His His Ala Asp Leu Thr Cys Thr Thr Thr Leu Asp
325 330 335

Leu Thr Asp Gly Thr Ile Thr Phe Asn Asn Asn Leu Gly Thr Gly Thr
340 345 350

Glu Ala Asn Gln Ala Tyr Ser Val Pro Thr Lys Met Gly Ser Lys Leu
355 360 365

Glu Asp Ile Leu Met Asp Asp Thr Leu Ser Pro Val Gly Val Thr Asp
370 375 380

Pro Leu Leu Ser Ser Val Ser Pro Gly Ala Ser Lys Thr Ser Ser Arg
385 390 395 400

Arg Ser Ser Met Ser Met Glu Glu Thr Glu His Thr Cys
405 410

<210> 40

<211> 357

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SITIO

<222> (126)..(126)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

5 <220>

<221> SITIO

<222> (128)..(128)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

10 <220>

<221> SITIO

<222> (254)..(254)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

15 <220>

<221> SITIO

<222> (256)..(256)

<223> Xaa = cualquier aminoácido

20 <400> 40

ES 2 534 755 T3

Met Leu Glu Met Leu Glu Tyr Asn His Tyr Gln Val Gln Thr His Leu
 1 5 10 15

Glu Asn Pro Thr Lys Tyr His Ile Gln Gln Ala Gln Arg Gln Gln Gly
 20 25 30

Phe Tyr Lys Phe Glu Glu Gln Asn Arg Ala Glu Ser Glu Cys Pro Gly
 35 40 45

Met Asn Thr His Ser Arg Ala Ser Cys Met Gln Met Asp Asp Val Ile
 50 55 60

Asp Asp Ile Ile Ser Leu Glu Ser Ser Tyr Asn Glu Glu Ile Leu Gly
 65 70 75 80

Leu Met Asp Pro Ala Leu Gln Met Ala Asn Thr Leu Pro Val Ser Gly
 85 90 95

Asn Leu Ile Asp Leu Tyr Gly Asn Gln Gly Leu Pro Pro Pro Gly Leu
 100 105 110

Thr Ile Ser Asn Ser Cys Pro Ala Asn Leu Pro Asn Ile Xaa Arg Xaa
 115 120 125

Leu Thr Glu Ser Glu Ala Arg Ala Leu Ala Lys Glu Arg Gln Lys Lys
 130 135 140

Asp Asn His Asn Leu Ile Glu Arg Arg Arg Phe Asn Ile Asn Asp
 145 150 155 160

Arg Ile Lys Glu Leu Gly Thr Leu Ile Pro Lys Ser Asn Asp Pro Asp
 165 170 175

ES 2 534 755 T3

Met Arg Trp Asn Lys Gly Thr Ile Leu Lys Ala Ser Val Asp Tyr Ile
 180 185 190

Arg Lys Leu Gln Arg Glu Gln Gln Arg Ala Lys Glu Leu Glu Asn Arg
 195 200 205

Gln Lys Lys Leu Glu His Ala Asn Arg His Leu Leu Leu Arg Ile Gln
 210 215 220

Glu Leu Glu Met Gln Ala Arg Ala His Gly Leu Ser Leu Ile Pro Ser
 225 230 235 240

Thr Gly Leu Cys Ser Pro Asp Leu Val Asn Arg Ile Ile Xaa Gln Xaa
 245 250 255

Pro Val Leu Glu Asn Cys Ser Gln Asp Leu Leu Gln His His Ala Asp
 260 265 270

Leu Thr Cys Thr Thr Thr Leu Asp Leu Thr Asp Gly Thr Ile Thr Phe
 275 280 285

Asn Asn Asn Leu Gly Thr Gly Thr Glu Ala Asn Gln Ala Tyr Ser Val
 290 295 300

Pro Thr Lys Met Gly Ser Lys Leu Glu Asp Ile Leu Met Asp Asp Thr
 305 310 315 320

Leu Ser Pro Val Gly Val Thr Asp Pro Leu Leu Ser Ser Val Ser Pro
 325 330 335

Gly Ala Ser Lys Thr Ser Ser Arg Arg Ser Ser Met Ser Met Glu Glu
 340 345 350

Thr Glu His Thr Cys
 355

REIVINDICACIONES

5 1.Procedimiento para determinar si un sujeto tiene una predisposición o una susceptibilidad para desarrollar un cáncer elegido entre un melanoma cutáneo maligno, un cáncer de riñón y combinaciones de los mismos, que comprende determinar en una muestra biológica del sujeto si MITF (factor de transcripción asociado a la microftalmia) presenta o no una mutación que disminuye o impide la sumoilación de MITF, en donde la presencia de esta mutación es indicativa de que el sujeto tiene una predisposición o una susceptibilidad para desarrollar tal cáncer.

2.Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la mutación en MITF es una sustitución de un resto de lisina y/o de un resto de ácido glutámico de uno de los sitios de sumoilación de MITF o de los dos sitios.

10 3.Procedimiento según la reivindicación 2, en el que la mutación es la sustitución de un resto seleccionado de la siguiente tabla por cualquiera de los otros 19 aminoácidos.

Isoforma	SEQ ID n.º	Ref. Transcrito	Ref. Proteína	Primer sitio de sumoilación		Segundo sitio de sumoilación	
ISOFORMA 1	35	NM_198159	NP_937802	K289	E291	K417	E419
ISOFORMA 2	36	NM_198177	NP_937820	K273	E275	K401	E403
ISOFORMA 3	37	NM_006722	NP_006713	K288	E290	K416	E418
ISOFORMA 4	38	NM_000248	NP_000239	K182	E184	K316	E318
ISOFORMA 5	39	NM_198158	NP_937801	K182	E184	K310	E312
ISOFORMA 6	40	NM_198178	NP_937821	K126	E128	K254	E256

4.Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la mutación es una sustitución de K316 o de E318 de la isoforma 4 o del resto que corresponde en las otras isoformas de MITF.

15 5.Procedimiento según la reivindicación 4, en el que la mutación es una sustitución de E318 de la isoforma 4 o del resto que corresponde en las otras isoformas de MITF, preferiblemente por un resto de lisina.

6.Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones, en el que la mutación se detecta en la proteína o en el ácido nucleico.

7.Procedimiento según la reivindicación 6, que comprende

20 – la secuenciación completa o parcial de MITF, en particular de la región que comprende el resto que se sospecha que está mutado e incluso únicamente la secuenciación de este resto concreto; o

– la puesta de manifiesto del ADN genómico, del ARN o del ADNc con una sonda específica del mutante de MITF y finalmente con una sonda de control que es específica del MITF que no presenta esta mutación o del MITF silvestre; o

25 – la amplificación selectiva del mutante con una pareja de cebadores, en donde uno de los cebadores se hibrida específicamente con la secuencia que lleva la mutación a detectar.

8.Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la mutación se detecta indirectamente mediante la medición de la sumoilación de MITF, en donde una disminución de la sumoilación respecto a la proteína MITF silvestre indica la presencia de la mutación E318K.

30 9.Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la mutación se detecta por la determinación de la localización celular de MITF en inmunohistoquímica, en donde una localización nuclear es indicativa de la proteína MITF silvestre, mientras que una localización nuclear y citoplasmática es indicativa de la proteína MITF

con la mutación E318K.

10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones, en donde el cáncer es la combinación de un melanoma cutáneo maligno y de un cáncer de riñón.

5 11. Utilización *in vitro* de medios de detección de una mutación de MITF que disminuye o impide la sumoilación de MITF para determinar si un sujeto presenta o no una predisposición o una susceptibilidad para desarrollar un cáncer elegido de la lista siguiente: un melanoma cutáneo maligno, un cáncer de riñón y combinaciones de los mismos.

10 12. Utilización según la reivindicación 11, en la que los medios de detección pueden comprender o consistir en una sonda específica de MITF que lleva la mutación a detectar, una pareja de cebadores que permite la amplificación de un segmento nucleotídico que comprende la mutación a detectar, una pareja de cebadores de los que uno de ellos se hibrida específicamente con la secuencia que lleva la mutación a detectar, un anticuerpo específico del mutante de MITF a detectar, medios que permiten la detección y la medición de la sumoilación de MITF, controles negativos que permiten detectar que MITF no presenta la mutación a detectar, o combinaciones de los mismos.

15 13. Utilización según la reivindicación 11 o 12, en la que la mutación es la sustitución de un resto seleccionado de la tabla que viene a continuación por cualquiera de los otros 19 aminoácidos.

Isoforma	SEQ ID n.º	Ref. Transcrito	Ref. Proteína	Primer sitio de sumoilación		Segundo sitio de sumoilación	
ISOFORMA 1	35	NM_198159	NP_937802	K289	E291	K417	E419
ISOFORMA 2	36	NM_198177	NP_937820	K273	E275	K401	E403
ISOFORMA 3	37	NM_006722	NP_006713	K288	E290	K416	E418
ISOFORMA 4	38	NM_000248	NP_000239	K182	E184	K316	E318
ISOFORMA 5	39	NM_198158	NP_937801	K182	E184	K310	E312
ISOFORMA 6	40	NM_198178	NP_937821	K126	E128	K254	E256

14. Utilización según la reivindicación 13, en la que la mutación es una sustitución de K316 o de E318 de la isoforma 4 o del resto que corresponde en las otras isoformas de MITF.

20 15. Utilización según la reivindicación 15, en la que la mutación es una sustituciones de E318 de la isoforma 4 o del resto que corresponde en las otras isoformas de MITF, preferiblemente por un resto de lisina.

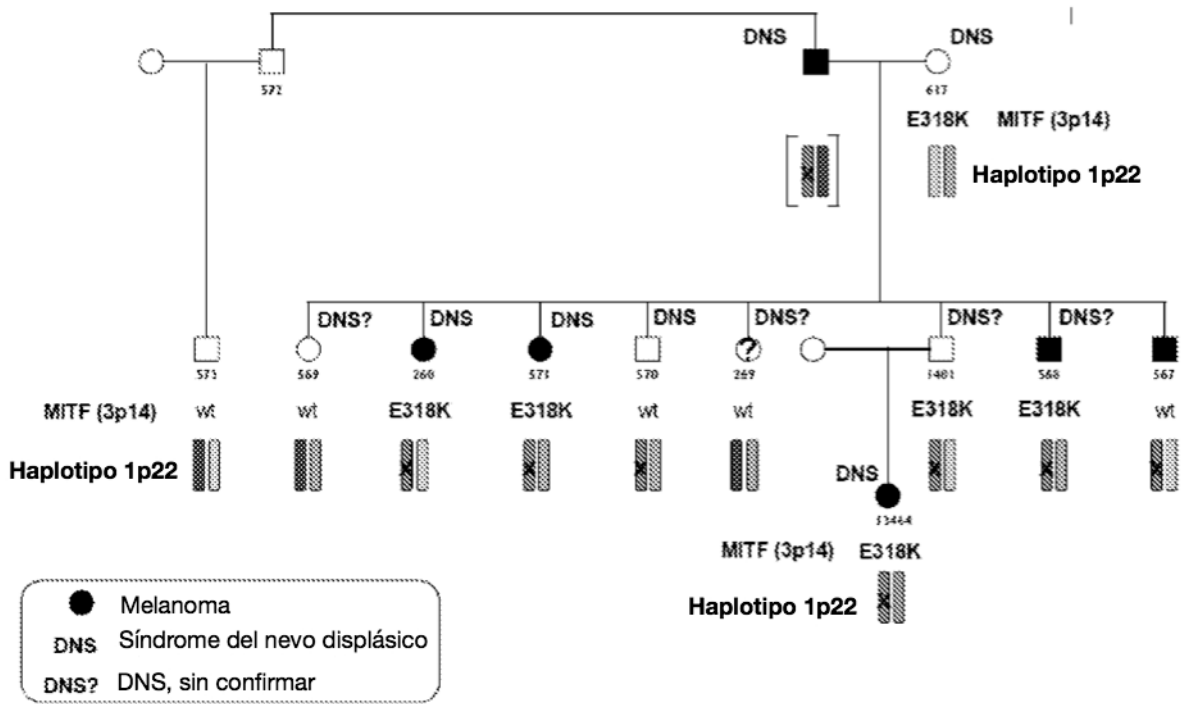


FIGURA 1a

Índice	91	101
Referencia	caagcaagaaccggt	
Referencia-AA	I K Q	E P
19034	CAAGCAA	AACCCGT
19034_MITF_ex10_F	CAAGCAAP	AACCCGT
19034_MITF_ex10_R	CAAgCAAP	AACCCGT

FIGURA 1b

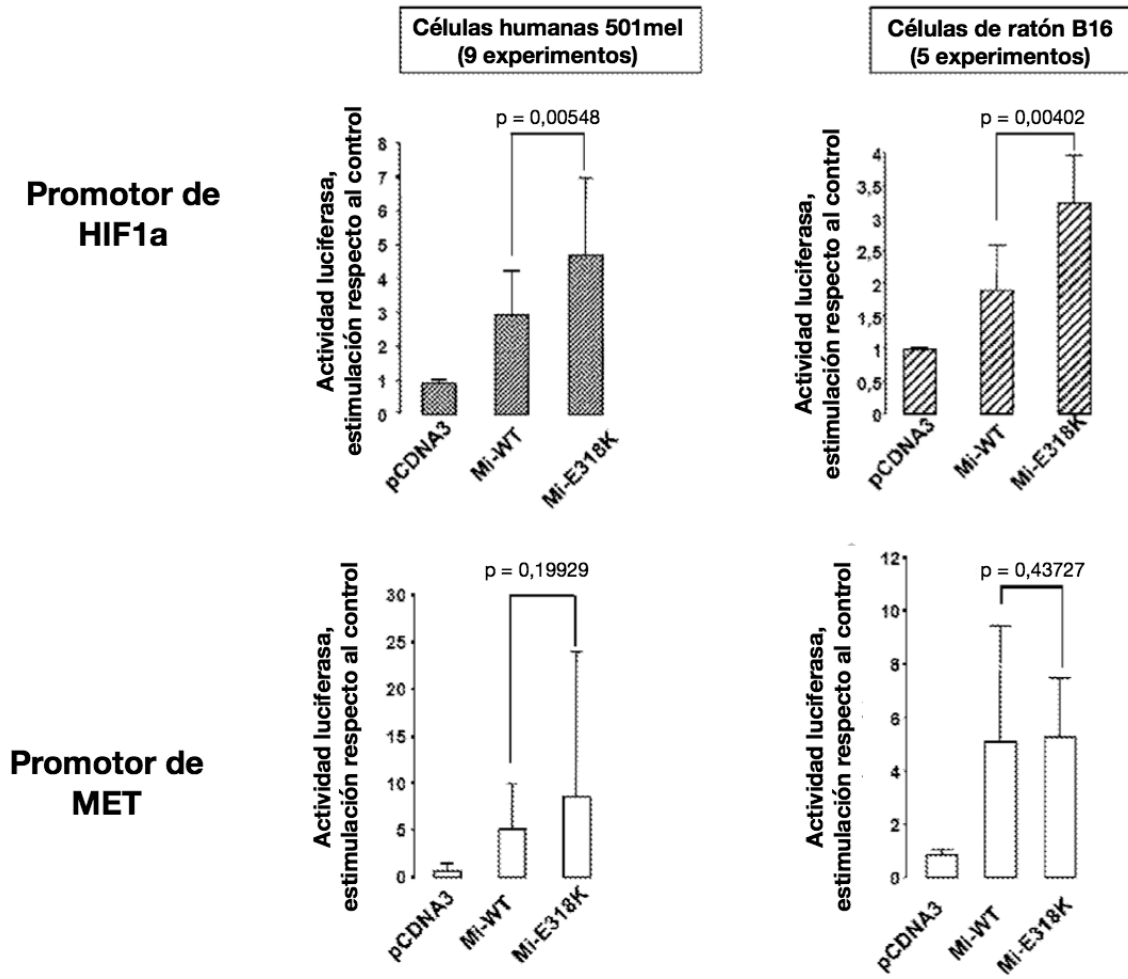


FIGURA 2

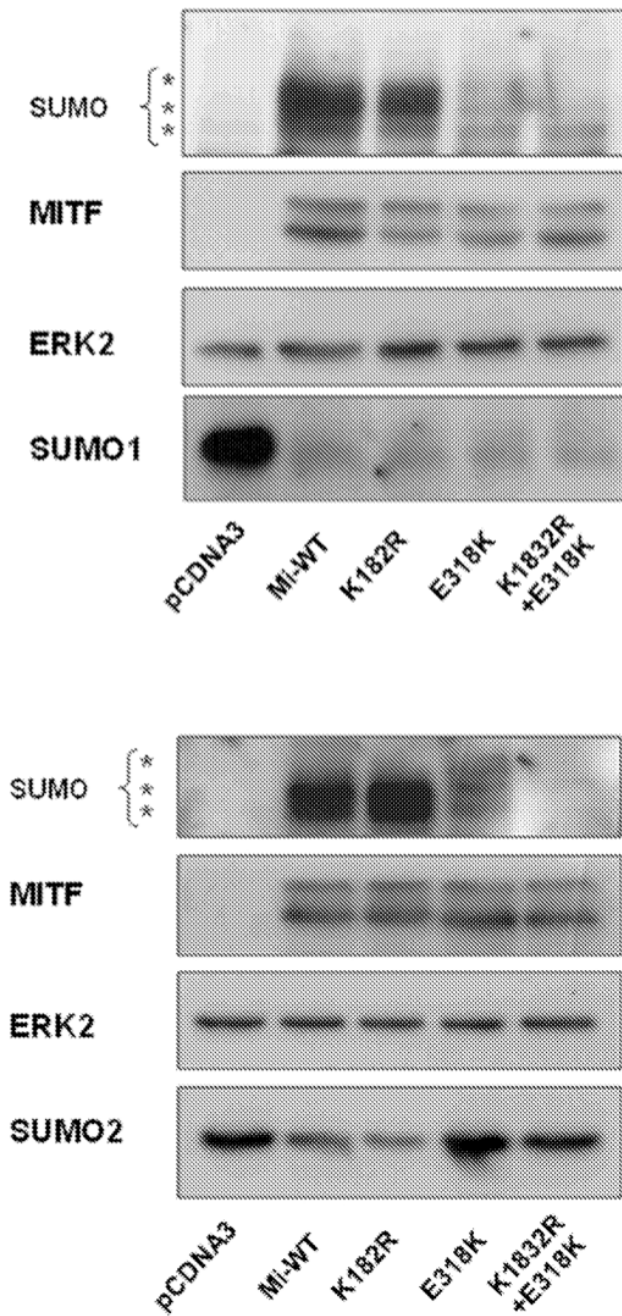


FIGURA 3

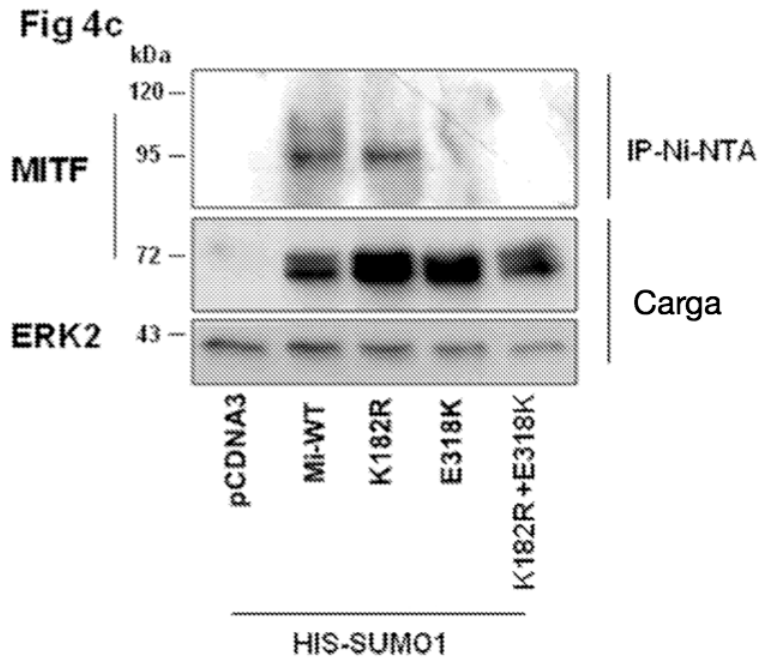
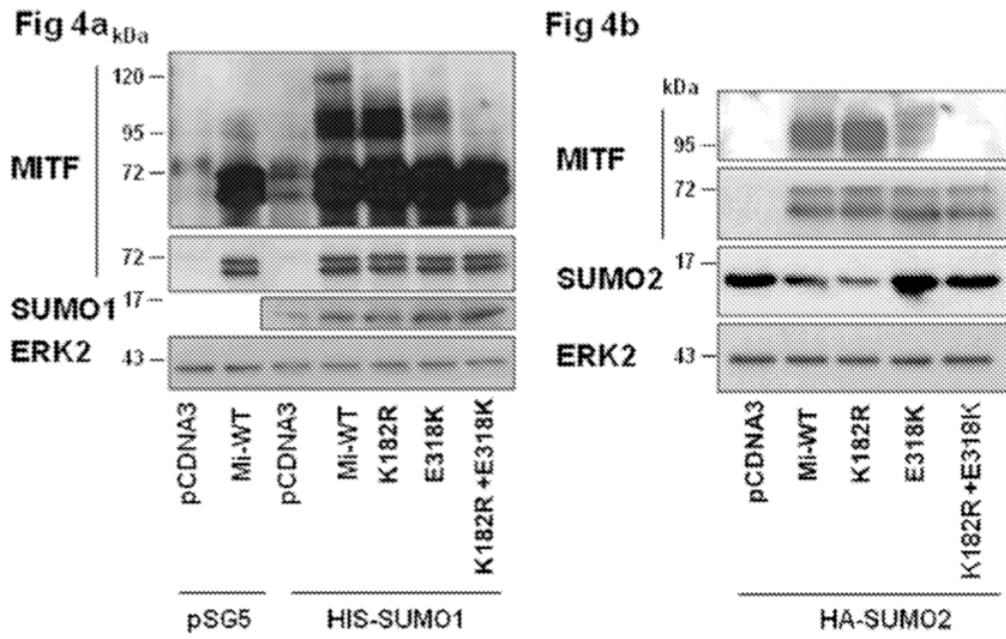


Fig 5a

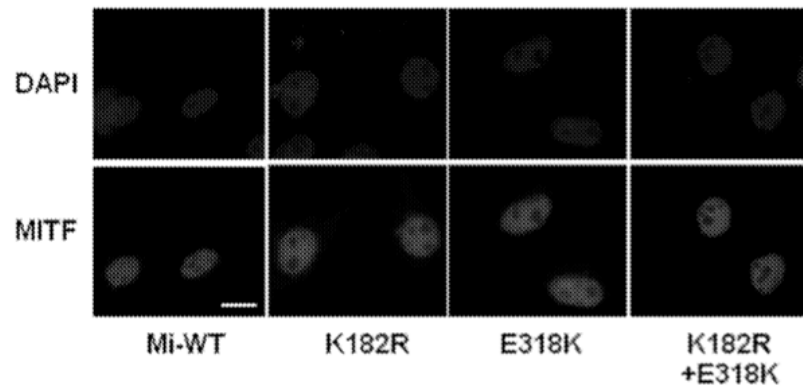


Fig 5b

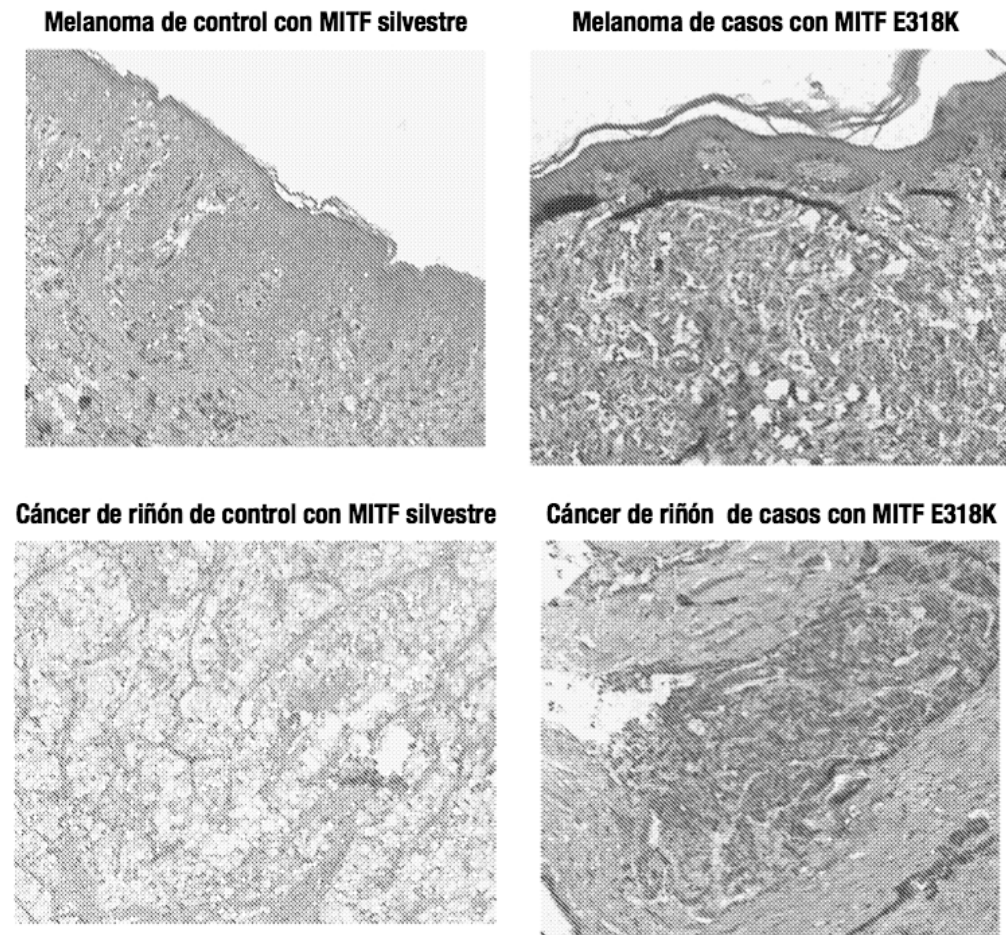


Fig 5c

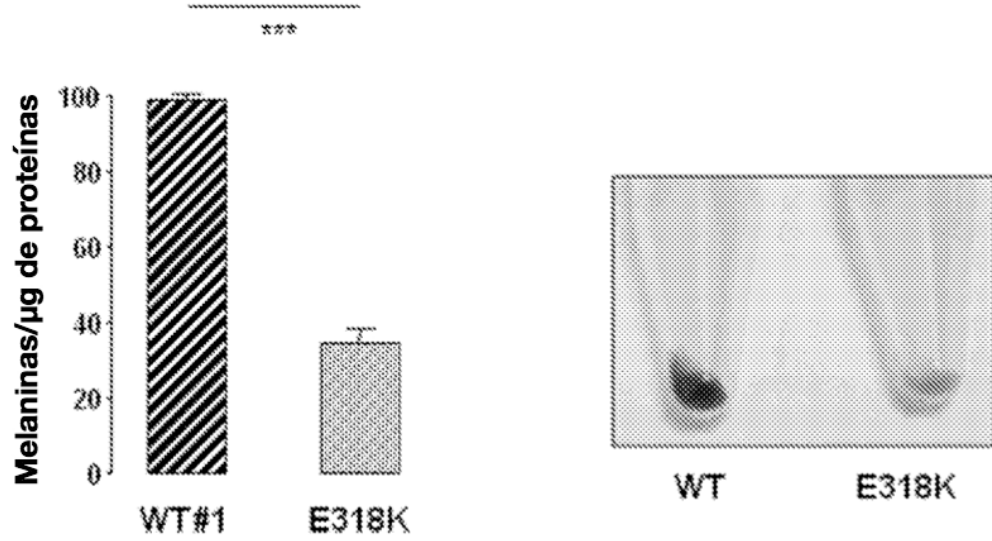
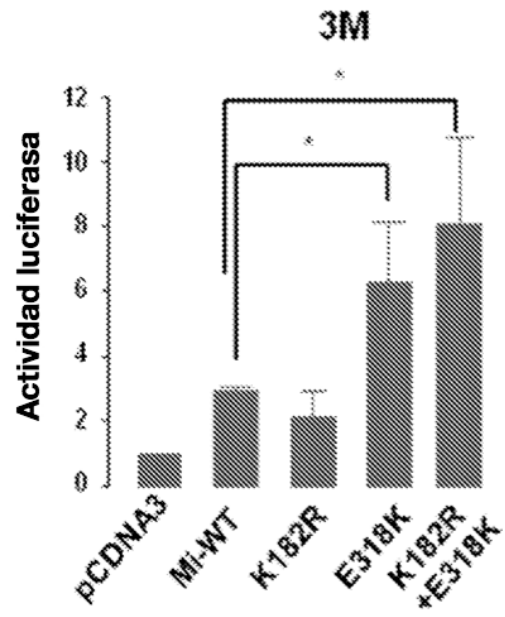


Figura 6

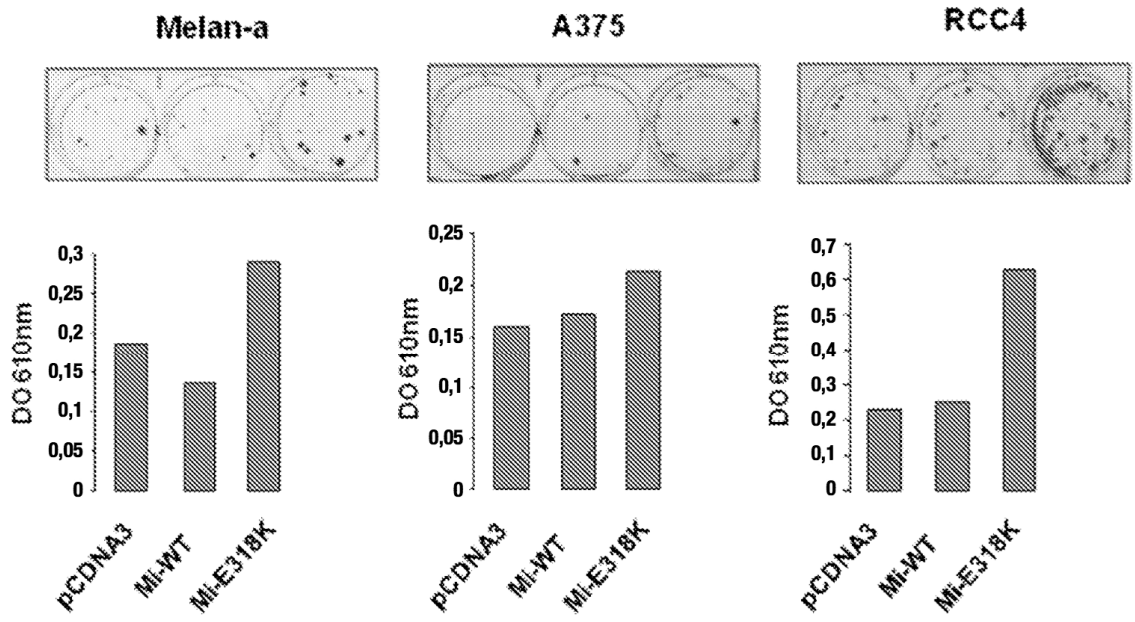


Figura 7