



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Título de Proyecto:

**“Generación de un sistema de recuperación de plásmidos
transfectados en líneas celulares humanas”**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias**

PRESENTA:

LBM. ILEANA JOCELYN FERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ

TUTOR PRINCIPAL:

**DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

COMITÉ TUTOR:

**DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**DR. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA
FACULTAD DE QUÍMICA**

Ciudad Universitaria, CD. MX. Septiembre, 2016



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.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN:	2
1.1 Generalidades.....	2
1.2 Epidemiología del cáncer de mama en México	3
1.3 Glándula mamaria.....	4
1.4 Clasificación molecular del cáncer de mama.....	5
1.5 Cáncer de mama triple negativo	7
1.6 Receptor de estrógenos alfa (ER α).....	8
1.7 Alteraciones epigenéticas sobre el receptor de estrógenos	11
1.8 Técnicas para el análisis de la regulación transcripcional.....	12
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:	22
3. JUSTIFICACIÓN:	22
4. HIPÓTESIS:	23
5. OBJETIVOS:	23
6. METODOLOGÍA:	25
7. MATERIAL Y MÉTODOS	28
7.1 Material biológico.....	28
7.2 Condiciones de Cultivo.....	29
7.3 Extracción de ADN.....	30
7.4 Diseño de Iniciadores.....	32
7.5 Condiciones para la amplificación de los promotores A y B del ER α	33
7.6 Condiciones para la amplificación del DBD de Gal4.....	34
7.7 Condiciones para la amplificación de Luciferasa	35
7.8 Clonación y Ligación.....	36
7.9 Transformación.....	36
7.10 Secuenciación	37
7.11 Transfección.....	38
7.12 Microscopia	40

7.13 Citometría de flujo	40
7.14 Extracción de RNA.....	41
7.15 RT- PCR	42
7.16 Western-Blot.....	42
8. RESULTADOS	44
8.1 Amplificación de los promotores A y B del receptor a estrógenos alfa (ER α)	44
8.2 Clonación del promotor A en el vector pCR2.1 TOPO	45
8.3 Direccionalidad del inserto en pCR2.1 TOPO.....	46
8.4 Comprobación de la obtención de pCR2.1-pAER α por PCR.....	47
8.5 Clonación de pABER α en el vector pCR2.1 TOPO	48
8.6 Subclonación de pABER α en pGL3Basic	51
8.7 Comprobación de la obtención del plásmido pGL3-pABER α	54
8.8 Ensayo comparativo entre la clonación de pAB del ER α en pCR2.1 TOPO y pGL3.55	
8.9 Amplificación por PCR de DBD _{Gal4}	56
8.10 Clonación del DBD _{Gal4} en el vector de expresión pcDNA3.1 NT-GFP TOPO.....	57
8.11 Secuenciación de los plásmidos: pGL3-pABER α , pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1 6xHis-GFP-DBD	60
8.12 Análisis bioinformático de la secuenciación.....	62
8.13 Transfección de pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD en la línea celular HEK-293T.....	65
8.14 Extracción de ARN y RT-PCR de HEK-293 Transfectadas	69
8.15 <i>Western-Blot</i> de HEK-293T Transfectadas.	71
8.16 Transfección de pGL3-pABER α en la línea celular HEK-293T	72
8.17 Extracción de ARN y RT-PCR de HEK-293 Transfectadas con pGL3-pABER α ...	73
9. DISCUSIÓN:	76
10. CONCLUSIONES	85
11. PERSPECTIVAS	85
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Esquema de las alteraciones que identifican a las células tumorales.	2
Fig.2. Gráfico de defunciones y tasa de incidencia de cáncer de mama en México de 1990 2010.....	3
Fig. 3. Esquema de la glándula mamaria.....	4
Fig. 4. Esquema de la clasificación molecular del cáncer de mama.	6
Fig. 5. Resistencia a la inmunoterapia por parte del cáncer de mama con fenotipo triple negativo.	7
Fig. 6. Esquema general del mecanismo de acción del receptor de estrógenos.....	9
Fig. 7. Esquema de la estructuración de la región codificante y regulatoria del gen del receptor de estrógenos alfa.....	10
Fig. 8. Representación general de las modificaciones epigenéticas que modifican la expresión por cambios en la compactación de la cromatina.	11
Fig. 9. Esquema de algunos factores que participan en la regulación de la expresión génica del receptor a estrógenos alfa (ER α).....	12
Fig. 10. Esquema de condiciones de PCR para los promotores A y B del ER α	34
Fig. 11. Esquema de condiciones de PCR para el dominio de unión a ADN de Gal4.....	27
Fig. 12. Esquema de condiciones de PCR para Luciferasa.....	35
Fig.13. PCR de los promotores A y B del ER α	44
Fig. 14. Restricción con la endonucleasa <i>Eco</i> RI del ADN de las clonas seleccionadas.....	45
Fig. 15. Mapa físico del vector de clonación pCR2.1 TOPO con su sitio de multiclonación.....	46
Fig. 16. Restricción con <i>Xho</i> I del ADN de las clonas seleccionadas durante la clonación del pAER α	47
Fig. 17. PCR del ADN de las clonas con pAER α en dirección 5'→3'.....	48
Fig. 18. Restricción con <i>Eco</i> RI de las clonas seleccionadas durante la clonación de pABER α	49
Fig. 19. Restricción con <i>Xho</i> I de las clonas seleccionadas con pCR2.1-pABER α	50
Fig. 20. PCR de las clonas seleccionadas con el plásmido pCR2.1-pABER α	51
Fig. 21. Mapa genético del plásmido pCR2.1-pABER α	52
Fig. 22. Mapa genético del vector pGL3Basic.	52
Fig. 23. Restricción de la clona 9 y del vector pGL3Basic con las enzimas <i>Kpn</i> I y <i>Xho</i> I.....	53
Fig. 24. PCR de las clonas resultantes de la ligación con el sistema “ShotGun”.....	47
Fig. 25. Restricción con <i>Kpn</i> I y <i>Xho</i> I del ADN plasmídico de las clonas resultantes del “ShotGun”.....	55
Fig. 26. Restricción de las clonas 9 y 1 con <i>Kpn</i> I- <i>Xho</i> I y <i>Hind</i> III. Mapas genéticos.....	56
Fig.27. Amplificación de DBD _{Gal4} a partir del plásmido pGBKT7.....	57
Fig. 28. Identificación por ensayos de restricción con <i>Hind</i> III de los plásmidos pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD.	58
Fig. 29. Restricción con <i>Kpn</i> I y <i>Eco</i> RV de los plásmidos pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD.....	58

Fig. 30. Comprobación de la transformación de las clonas por PCR y restricción con <i>KpnI</i> y <i>EcoRV</i>	59
Fig. 31. Electroferogramas del plásmido pGL3-pABER α	61
Fig.32. Electroferogramas de los plásmidos pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD	62
Fig. 33. BLAST de la secuenciación de pGL3-pABER α	63
Fig. 34. BLAST de la secuenciación de pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD	64
Fig. 35. Micrografías de fluorescencia y sobreposición o “merge” de HEK-293T transfectadas.....	66
Fig. 36. Micrografía de fluorescencia de células HEK-293T transfectadas teñidas con <i>Hoechst-33334</i>	67
Fig. 37. Histogramas de la citometría de flujo de las células HEK-293T sin transfectar o transfectadas con las diferentes construcciones.....	68
Fig. 38. Extracción de ARN total de HEK-293T Transfectadas.....	70
Fig. 39. Análisis electroforético de la RT-PCR de DBD y GAPDH.	70
Fig. 40. <i>Western-Blot</i> con anticuerpo dirigido a GFP de HEK-293T Transfectadas.....	71
Fig. 41. <i>Western-Blot</i> con anticuerpo dirigido a DBD _{Gal4} de HEK-293T Transfectadas.....	72
Fig. 42. Microscopía de fluorescencia y campo claro de HEK-293T transfectadas.....	73
Fig. 43. Extracción de ARN total de HEK-293T Transfectadas.....	74
Fig. 44. Análisis electroforético de la RT-PCR de pABER α y luciferasa	75
Fig. 45. Análisis electroforético de la RT-PCR de GAPDH.....	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores que se han visto implicados en la regulación epigenética del ER α	13
Tabla 2. Técnicas utilizadas para analizar la regulación transcripcional.	15
Tabla 3. Iniciadores para la amplificación del promotor A del receptor de estrógenos alfa (ESR1).32	
Tabla 4. Iniciadores para la amplificación del promotor B del receptor de estrógenos alfa (ESR1).32	
Tabla 5. Iniciadores para la amplificación del DBD _{Gal4}	32
Tabla 6. Iniciadores para la amplificación de Luciferasa.....	33
Tabla 7. Secuencia sintetizada para UAS _{Gal4} y el iniciador para la comprobación de su clonación en pGL3-pABER α respectivamente.	33
Tabla 8. Resumen de datos de la citometría de flujo.....	69

ABREVIATURAS

- ☐ **ER α** : Receptor de estrógenos alfa
- ☐ **pAER α** : Promotor A del receptor de estrógenos alfa
- ☐ **pBER α** : Promotor B del receptor de estrógenos alfa
- ☐ **pABER α** : Promotor A y B del receptor de estrógenos alfa
- ☐ **DBD_{Gal4}**: Dominio de unión a ADN del factor transcripcional Gal4
- ☐ **UAS_{Gal4}**: Elementos de respuesta a Gal4 (Secuencias de reconocimiento para la unión de DBD_{Gal4})
- ☐ **EMSA**: Análisis de cambio de movilidad electroforético
- ☐ **BrEt**: Bromuro de Etidio
- ☐ **BCNL**: Cáncer de mama triple negativo
- ☐ **BCBL**: Cáncer de mama basaloide
- ☐ **BCTN**: Cáncer de mama normaloide
- ☐ **BL1**: Cáncer de mama triple negativo basaloide tipo 1
- ☐ **BL2**: Cáncer de mama triple negativo basaloide tipo 2
- ☐ **IM**: Cáncer de mama triple negativo inmuno-modulador
- ☐ **M**: Cáncer de mama triple negativo mesenquimal
- ☐ **MSL**: Cáncer de mama triple negativo mesenquimal tipo célula madre
- ☐ **LAR**: Cáncer de mama triple negativo luminal con la vía de señalización del receptor de andrógenos activa
- ☐ **CL**: Cáncer de mama triple negativo bajo en claudina

RESUMEN

En la actualidad el estudio de la interacción entre proteínas y ADN se restringe a técnicas como EMSA, *footprinting DNAasa*, inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y sus variantes, sin embargo, estas técnicas tienen sus limitantes ya que brindan un panorama general que requiere obligatoriamente del conocimiento previo de al menos uno de los elementos reguladores asociados a la cromatina en el locus de interés. Actualmente ninguna metodología facilita un análisis comparativo de la composición proteica de la cromatina en un locus específico como el del ER α (Receptor de estrógenos alfa) implicado en la respuesta clínica de las pacientes con cáncer. Diversos grupos de investigación han concluido que dicha problemática requiere del desarrollo de nuevas herramientas. Nosotros proponemos un sistema que permita identificar diferencias en el revestimiento proteico de la cromatina que pudieran asociarse a la respuesta clínica que presentan las pacientes que son diagnosticadas con cáncer de mama triple negativo (aquellas que no expresan los receptores Her-2, ER α y PR β). El presente trabajo se enfocó en la generación de un sistema tipo “presa-anzuelo”, que permita estudiar el revestimiento proteico de regiones específicas de la cromatina, mediante la construcción de dos plásmidos: pGL3-pABER α y pcDNA3.1-GFP-DBD, los cuales se transfectaron en la línea celular de riñón embrionario humano HEK-293T. La expresión de la proteína recombinante “anzuelo” (GFP-DBD) se evaluó por microscopía de fluorescencia, citofluorometría y *Western blot*. Por otro lado, se validó la obtención y funcionalidad del plásmido “presa” (pGL3-pABER α) mediante RT-PCR, PCR y ensayos de restricción. Con base en los datos obtenidos, se demostró que el sistema de expresión de la proteína recombinante “anzuelo” es eficiente, sin embargo, falta por demostrar si esta proteína tiene la capacidad de unirse al plásmido “presa”. A pesar de contar con una construcción del plásmido “presa”, éste aún carece de los elementos de respuesta al factor transcripcional de levadura Gal4 (UAS_{Gal4}), esenciales para la unión con la proteína “anzuelo”. El montaje completo de un sistema de este tipo, podría contribuir al análisis del revestimiento proteico de la cromatina de un locus específico implicado en estados patológicos como el cáncer.

1. INTRODUCCIÓN:

1.1 Generalidades

El cáncer es una patología heterogénea, la cual se caracteriza por la acumulación de diversos cambios a nivel del genoma, en donde se encuentran involucrados una amplia variedad de genes, muchos de ellos con función desconocida. Todas estas modificaciones llevan finalmente al establecimiento de una proliferación celular descontrolada. El incremento de la proliferación (por independencia a señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias, evasión de los programas de muerte celular), la pérdida de inhibición por contacto y de la estructura membranal, así como la presencia de vesículas en el citoplasma e inmortalidad, son algunas de las alteraciones que identifican a una célula tumoral. (Fig. 1). (Hanahan and Weinberg., 2000).



Fig.1. Esquema de las alteraciones que identifican a las células tumorales.

1.2 Epidemiología del cáncer de mama en México

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer más frecuente entre las mujeres es el de mama, que a nivel mundial representa el 16% de todos los cánceres femeninos. Se estima que cada año se detectan 1.38 millones de casos nuevos. Este padecimiento representa la primer causa de muerte por cáncer en la población femenina de países desarrollados, pero tiene mayor impacto en la población de países de bajos y medios ingresos como México en donde representa uno de los mayores problemas de salud tanto por su incidencia como por su elevada tasa de mortalidad (Curado, 2011). En cuanto a México, el cáncer de mama ocupa desde el año 2006 el primer lugar de mortalidad por tumor maligno en las mujeres mayores de 25 años, desplazando al cáncer cervicouterino; en 2010 la tasa de mortalidad fue de 18.7 por 100 mil mujeres de 25 y más años, lo cual representa un incremento del 49.5% en los últimos 20 años. (Fig. 2.) (Curado, 2011).

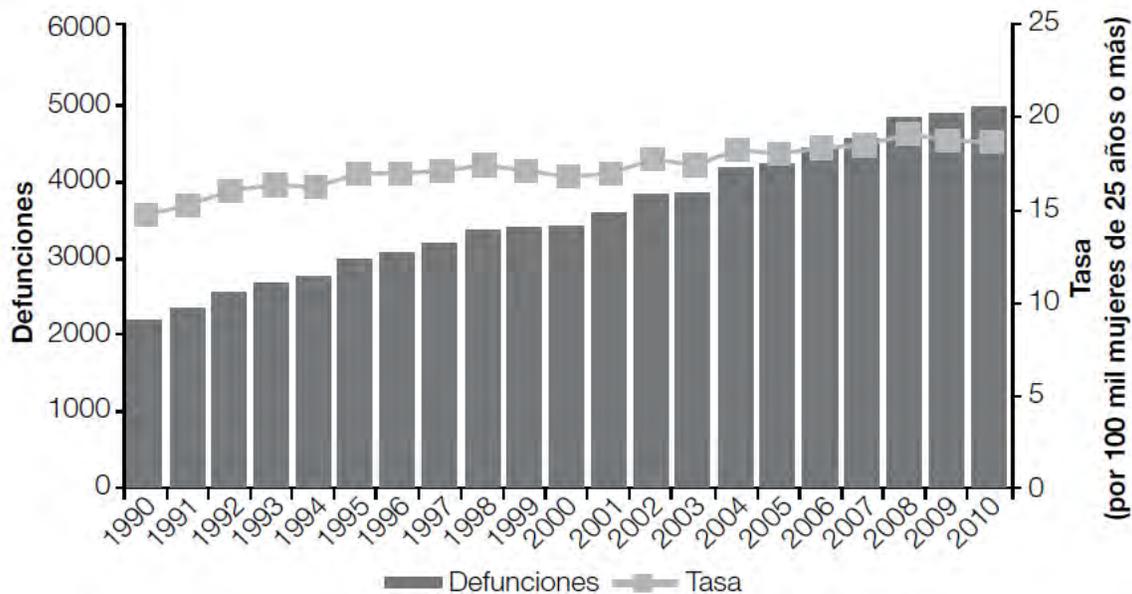


Fig. 2. Gráfico de defunciones y tasa de incidencia de cáncer de mama en México de 1990-2010. Fuente: CENIDSP/INSP. Base de datos de defunciones 1990-2010

1.3 Glándula mamaria

La glándula mamaria está conformada por diversos tipos celulares que incluyen a las células mioepiteliales, epiteliales ductales y alveolares (Fig.3). Estas células epiteliales se disponen en dos capas perfectamente diferenciadas: la capa basal y luminal (dependiendo si se encuentran en el lumen o en la base de la glándula mamaria). Con base en esta diversidad celular, se ha llevado a cabo una clasificación de los tumores mamarios en diferentes subgrupos, los cuales son seleccionados por la presencia de ciertos marcadores biológicos específicos. Los marcadores utilizados son las citoqueratinas 5 y 17, la integrina $\beta 1$ o la laminina, para el caso de las células basales, o bien las citoqueratinas 8 y 18 que son características de las células luminales, si las células cancerosas llegan a presentar este tipo de marcadores, se clasifican como luminales o basales, según sea el caso. No obstante los avances en la investigación moderna han permitido la identificación de una serie de marcadores moleculares en cáncer de mama, algunos de estos marcadores tienen valor pronóstico debido a que se correlacionan con las tasas de supervivencia, en cambio otros son de utilidad predictiva ya que permiten seleccionar a pacientes por su buena respuesta a una determinada estrategia terapéutica (Esteva and Hortobagyi., 2004). Estos marcadores moleculares son los receptores ER α (receptor de estrógenos alfa), PR β (receptor de progesterona beta) y HER-2 (receptor de 2 del factor de crecimiento epidérmico humano).

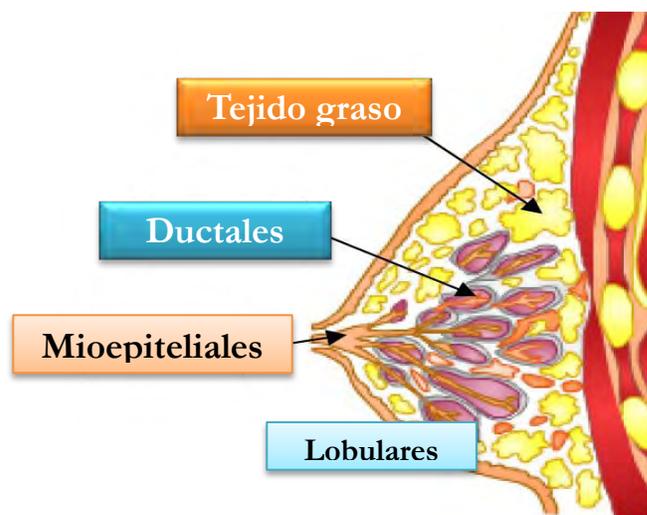


Fig. 3. Esquema de la glándula mamaria

1.4 Clasificación molecular del cáncer de mama

En base a los marcadores moleculares, se ha realizado otra clasificación importante de los tumores mamarios basada en la presencia o ausencia de los receptores HER-2 (Receptor de 2 del factor de crecimiento epidérmico humano), ER α (receptor de estrógenos alfa) y PR β (receptor de progesterona beta). Se ha demostrado que la expresión de ER α y HER-2 representa los determinantes principales de los subgrupos moleculares del cáncer de mama (Sorlie *et. al.* 2001). Considerando la expresión de estos receptores aunado a las dos capas celulares mamarias (luminal y basal), se establecieron cinco subgrupos moleculares. Dos subtipos que son ER α (receptor de estrógenos alfa) positivos: luminal A y luminal B que expresan las citoqueratinas CK7, CK8, CK18, y CK19, integrina alfa-6 MUC1, BCL2, ER α , PR β , GATA3, así como moléculas de adhesión epiteliales, por lo que este tumor se origina de células luminales diferenciadas. Y otros tres, caracterizados por tener una expresión baja de ER α y que denominaron: “erbB2-like/HER-2-like” que muestran expresión aumentada de genes asociados con el erbB2, “mama normal-like (BCNL)” porque comparte características del tejido mamario normal y el “basaloide (BCBL)” caracterizado por la presencia de células mioepiteliales que expresan citoqueratinas basales como CK5/6, CK14, CK17, vimentina, p-caderina, caveolinas, EGFR(receptor del factor de crecimiento epidérmico), así mismo carecen de la expresión de ER α , PR β , HER-2 (Fig. 4) (Sorlie *et. al.* 2001). Esta clasificación no solo es importante por las características moleculares, sino también porque los subtipos pueden pronosticar el comportamiento clínico de la supervivencia libre de enfermedad.

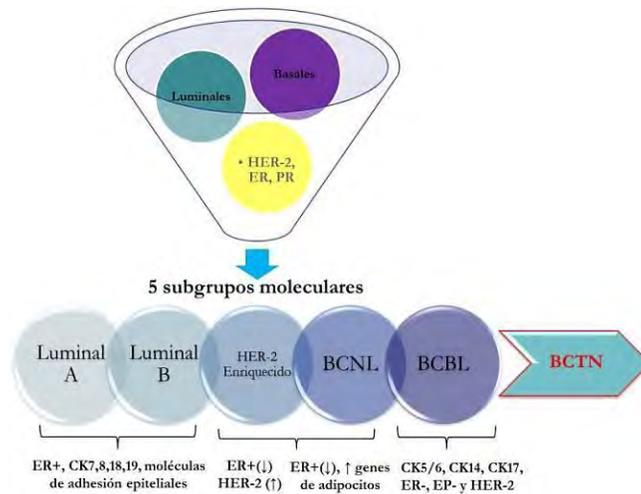


Fig.4. Esquema de la clasificación molecular del cáncer de mama. En donde podemos ver que dependiendo de los marcadores moleculares como las citoqueratinas o los receptores hormonales que expresen las células cancerosas, estos pueden ser incluidos dentro del grupo luminal A, B, enriquecido con Her-2, normal o basaloide.

Tabla de los subgrupos moleculares de cáncer de mama y sus características.

TIPOS SUBMOLECULARES DE CÁNCER DE MAMA		
TIPO	MARCADORES Presentes	CARACTERÍSTICAS
Luminal A	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Positivo a ERα y PRβ ✓ Her-2 negativo ✓ Bajo Ki67 ✓ Citoqueratinas 7, 8, 18 y 19 	Las células cancerosas comparten una morfología similar a las células que se encuentran recubriendo los ductos mamarios. Tiene el mejor pronóstico clínico. Se origina de células luminales diferenciadas.
Luminal B	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Positivo a ERα y/o PRβ ✓ Her-2 positivo ✓ Her-2 negativo y alta expresión de Ki67 ✓ Moléculas de adhesión epiteliales 	Las células cancerosas comparten una morfología similar a las células que se encuentran recubriendo los ductos mamarios. Tienen una alta tasa de proliferación en comparación con los luminal A.
Enriquecido con Her-2	<ul style="list-style-type: none"> ✓ ERα negativo o baja ✓ PRβ negativo ✓ Her-2 positivo 	Pueden ser detectados a una edad temprana, son positivos al crecimiento de ganglios linfáticos. El 30% puede no expresar Her-2.
Normaloide (BCNL)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Baja expresión de ERα ✓ Expresión de 	Comparte características con el tejido mamario normal.
Basaloide (BCBL)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Negativo a los receptores ERα, PRβ y Her-2 ✓ Citoqueratinas 5, 6, 14 y 17 ✓ Vimentina, p-caderina 	Los tumores tienen células con características similares a las de las células exteriores que rodean los conductos mamarios. Son más agresivos y tienen mal pronóstico clínico.

1.5 Cáncer de mama triple negativo

La ausencia de ER α (receptor de estrógenos alfa), PR β (receptor de progesterona beta) y HER-2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano), es la característica esencial del cáncer de mama conocido como triple negativo (BCTN). El BCTN aparece en mujeres jóvenes y por lo regular se le asocia con mal pronóstico clínico ya que crece rápidamente y es altamente invasivo. Este tipo de cáncer a su vez se subclasifica en siete diferentes subtipos los cuales son el basaloide 1 (BL1), basaloide 2 (BL2), inmunomodulador (IM), mesénquimal (M), mesenquimal tipo célula madre (MSL), luminal con receptor de andrógenos (LAR) y bajo en claudina (CL). Los subtipos BL1 y BL2 tienen elevada la expresión de genes referentes a ciclo celular y respuesta al daño de DNA, mientras que los M y MSL están enriquecidos con genes involucrados en la transición de epitelio-mesénquima así como diferentes factores de crecimiento. Por otro lado, el subtipo LAR se caracteriza principalmente por la presencia de la vía de señalización dependiente del receptor a andrógenos. La carencia de los receptores ER α (receptor de estrógenos alfa), PR β (receptor de progesterona beta) y HER-2 (receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano) hacen al cáncer de mama triple negativo resistente a diversas terapias. (Fig. 5). (Seal *et. al.* 2010; Clark., *et. al.* 1984; Talman *et. al.* 2008; Jordan *et. al.* 2007).

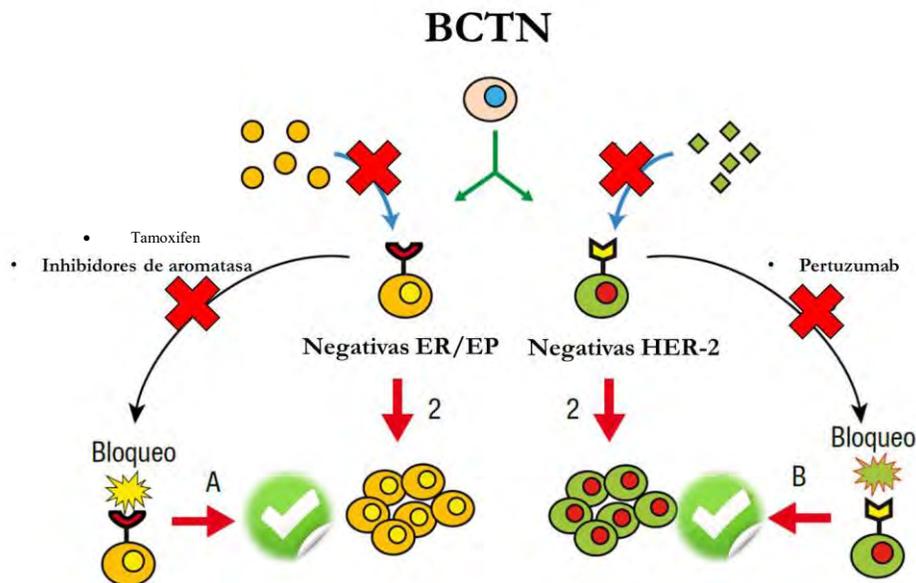


Fig. 5. Resistencia a la inmunoterapia por parte del cáncer de mama con fenotipo triple negativo.

1.6 Receptor de estrógenos alfa (ER α)

Diferentes mecanismos moleculares han ocasionado la resistencia de células tumorales a la terapia con Tamoxifen, dentro de los cuales está la modificación de la expresión del receptor de estrógenos alfa (ER α). El receptor de estrógenos alfa es un factor transcripcional, que pertenece a la familia de receptores nucleares, el cual regula la expresión de diversos genes involucrados en el desarrollo, reproducción, diferenciación y transformación, así como en la maligna progresión del cáncer (Osborn *et. al.* 2001; Hayashi *et. al.* 2003). El ER α (receptor de estrógenos alfa) regula la expresión de estos genes, cuando se une a pequeñas secuencias del ADN que se denominan ERE o elementos de respuesta a estrógenos, que usualmente se encuentran en los promotores de los genes regulados (Klinge., 2001). Los EREs tienen como característica que poseen una secuencia consenso de 13 pb, que contiene dos repetidos invertidos de 5'-GGGATC-3' (Fig. 6).

En la actualidad se conocen tres tipos de receptores a estrógenos: ER α (receptor de estrógenos alfa), ER β (receptor de estrógenos beta) y ERm (receptor de estrógenos membranal), los dos primeros forman dímeros en el núcleo después de unirse al 17 β estradiol. De los tres tipos de receptores, los receptores alfa y beta del receptor de estrógenos (ER α y ER β) son los más estudiados en el cáncer de mama, ya que se ha observado que regulan algunos de los genes implicados en la carcinogénesis, como *c-fos* y *c-myc*, que promueven el desarrollo de un fenotipo maligno en las células al producir un descontrol en el ciclo celular y apoptosis (Bland *et. al.* 2007).

La determinación de los receptores de estrógenos tiene gran utilidad como marcador tumoral, ya que se ha descrito que los tumores mamarios positivos a ER α (receptor de estrógenos alfa) son diferenciados y con baja proliferación, además en la clínica muestran tiempo prolongado de supervivencia libre de enfermedad y buena respuesta a terapia dirigida contra la señalización errada del ER α (receptor de estrógenos alfa). Mientras que los tumores negativos a ER α (receptor de estrógenos alfa), son poco diferenciados, aneuploides, altamente proliferativos y con una baja respuesta a tratamientos anti-ER α (Nilsson *et. al.* 2001).

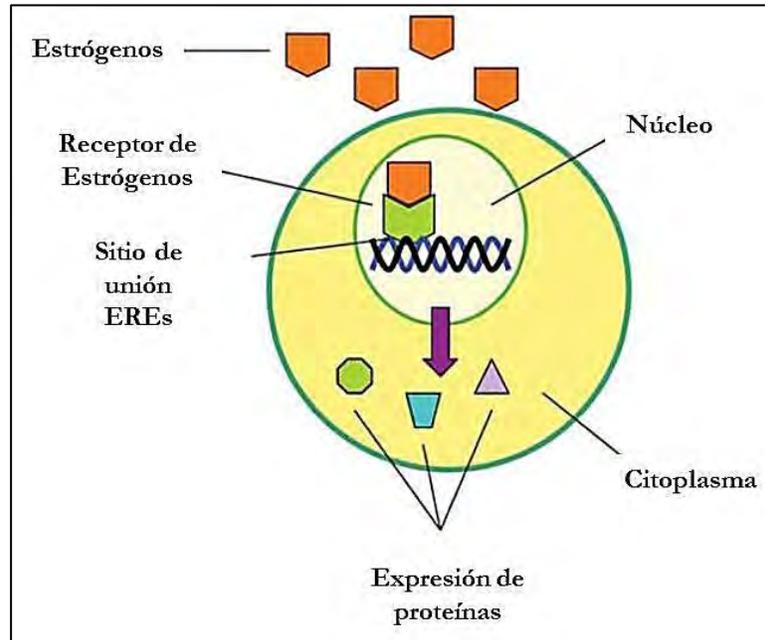


Fig. 6. Esquema general del mecanismo de acción del receptor de estrógenos.

El gen codificante del receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$) es una gran unidad genética que se expande aproximadamente 300 Kb del cromosoma 6 (6q25.1), de las cuales 140 Kb corresponden a sus ocho exones (Walter *et. al.* 1985; Gosden *et. al.* 1986). El gen se transcribe a partir de al menos dos promotores, dando como resultado una variación del transcrito en la región 5' UTR (Ponglikitmongkol *et. al.* 1988). El gen del $ER\alpha$ (receptor de estrógenos alfa) contiene más de un promotor en donde puede iniciar el proceso de transcripción, lo cual podría tener implicaciones sobre la regulación de la expresión del gen, ya que es probable que la activación de uno u otro promotor sea tejido específica, dando como resultado RNAm característicos para cada tejido (Fig. 7). Se ha demostrado que en diferentes líneas celulares de cáncer de mama el promotor A del $ER\alpha$ (receptor de estrógenos alfa) es el que se encuentra activo preferentemente (Grandien *et. al.* 1995). De igual modo se ha descrito que un incremento en la utilización del promotor A, trae como consecuencia una disminución de la transcripción del gen de $ER\alpha$ (receptor de estrógenos alfa) a partir del promotor B (Weigel *et. al.* 1995).

En diferentes estudios se ha intentado caracterizar a los promotores del $ER\alpha$ (receptor de estrógenos alfa), los cuales han arrojado información sobre la presencia de

elementos potenciadores y de diferentes factores de transcripción que están involucrados en la regulación de estos promotores en diferentes líneas celulares (Schuur *et. al.* 2001; deConinck *et. al.* 1995; Penolazzi *et. al.* 2000). No obstante, se ha observado que el ER α (receptor de estrógenos alfa) tiene la capacidad de autorregulación. Cabe destacar que los promotores del receptor de estrógenos alfa no tienen la caja TATA y CCAAT o la caja de secuencias GC o si están presentes no muestran la secuencia consenso bien establecida, consecuente a esto se han identificado múltiples sitios de inicio de la transcripción en la región 5' de los exones. De igual modo, se ha demostrado que los promotores del ER α son más débiles comparados con otros promotores (Penolazzi *et. al.* 2000; Castles *et. al.* 1997). Los bajos niveles de actividad transcripcional del promotor aseguran que los niveles de la expresión de la proteína sean bajos y de esta forma no se pueden activar diferentes vías de regulación que no sean necesarias para la célula.

La presencia de múltiples promotores del ER α (receptor de estrógenos alfa) se ha discutido en los últimos años, llegando a tres posibles hipótesis: 1) estos son usados de forma tejido dependiente, 2) el uso de los promotores es dependiente de la etapa de desarrollo en la que se encuentre el organismo y 3) los transcritos del ER α se producen a partir de varios promotores, para producir diferentes cortes alternativos, lo cual resultaría en la expresión de diversas isoformas del receptor. Así mismo cabe la posibilidad de que todos los promotores se encuentren activos en todos los tejidos resultando en una expresión basal del RNAm del ER α y que la mayor activación de un promotor en específico (dependiendo del tejido) potencialice su transcripción de acuerdo a los requerimientos de la célula (Hayashi *et. al.* 2003) Otra característica de estos promotores, es que se encuentran a una distancia considerable entre ellos, lo que podría permitir una regulación epigenética de la expresión del gen del ER α (receptor de estrógenos alfa) (Kos., *et. al.* 2001).

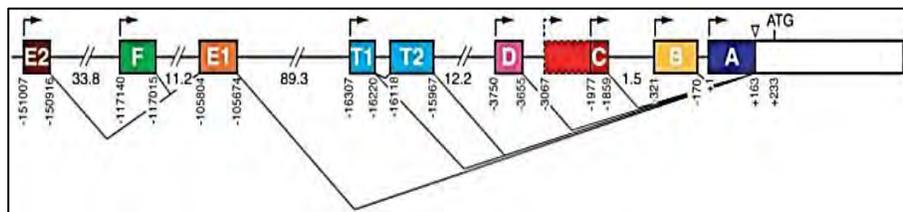


Fig. 7. Esquema de la región codificante y regulatoria del gen del receptor de estrógenos alfa. En donde se puede observar al menos 8 promotores en los cuales se podría iniciar la transcripción del ER α .

1.7 Alteraciones epigenéticas sobre el receptor de estrógenos

Las alteraciones epigenéticas que incluyen modificaciones en el ADN, histonas y cromatina, juegan un papel importante en la regulación de la transcripción, este tipo de alteraciones son reversibles y pueden ocurrir rápidamente durante un cambio ambiental (Fig. 8). (Bernstein *et. al.* 2007). En los últimos años se ha incrementado evidencia acerca de que este tipo de modificaciones están implicadas en diferentes padecimientos, lo cual podría ser utilizado en un futuro para diagnóstico, pronóstico y predicción de la respuesta a terapias establecidas (Heyn *et. al.* 2012).

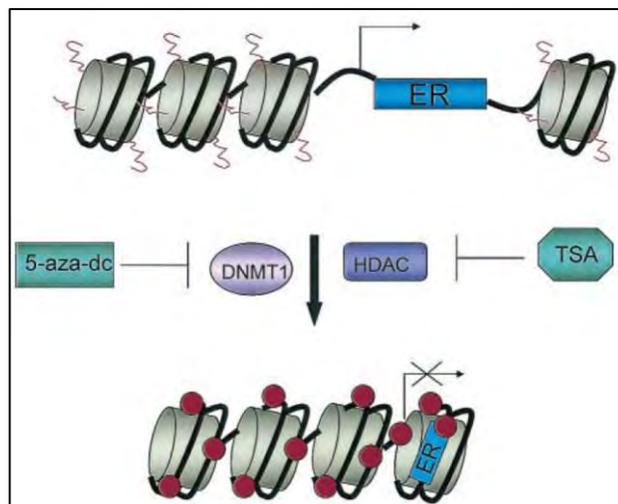


Fig. 8. Representación general de las modificaciones epigenéticas que regulan la expresión por cambios en la compactación de la cromatina. Los tratamientos con 5-aza-citidina (5-aza-dc) inhiben la actividad de las enzimas DNAmetil transferasas involucradas en la adición de grupos metilo sobre el ADN que llevan a un cambio conformacional de la cromatina repercutiendo en el silenciamiento génico. Por otro lado, algunos agentes como la tricostatina A (TSA) inhiben la actividad de las histonas desacetilasas (HDAC) que eliminan los grupos acetilos de los tallos de las histonas favoreciendo la formación de heterocromatina.

Algunos estudios han sugerido que las alteraciones epigenéticas están implicadas en la resistencia al tratamiento con Tamoxifen en cáncer de mama, y que esto se relaciona directamente con la regulación de los niveles de expresión del ER α (receptor de estrógenos alfa). Considerando además la complejidad de los promotores de ER α , no sería sorprendente que numerosos factores, aún desconocidos, afectaran la expresión del receptor (Fan *et. al.* 2006; van Agthoven *et. al.* 1994; Konduri *et. al.* 2010). No obstante, se ha postulado que el mecanismo de metilación no es el único proceso para inactivar la expresión del receptor de estrógenos alfa, ya que hay evidencia creciente de que el silenciamiento de la expresión tienen asistencia de las enzimas histonas desacetilasas

(HDAC), que se encargan de la remoción de grupos acetilos de los residuos de lisina que se encuentran en los tallos de las histonas, específicamente las histonas H3 y H4, **que repercute en la** formación de estructuras más compactas de la cromatina, con lo cual disminuye la accesibilidad del gen para ser transcrito (Fig. 9) (Yang *et. al.* 2000).

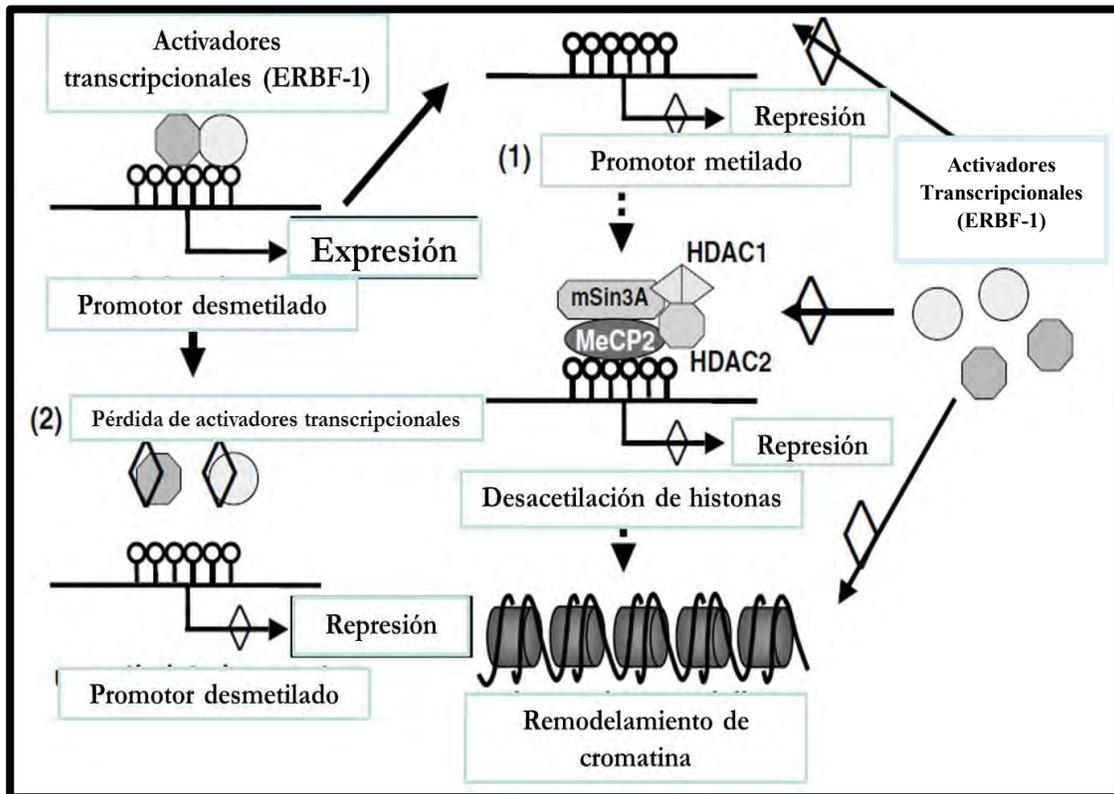


Fig. 9. Esquema de algunos factores que participan en la regulación de la expresión génica del receptor de estrógenos alfa (ERα). Cuando los activadores transcripcionales como ERBF-1 se encuentran sobre el promotor del ERα así como el ADN desmetilado, la expresión del receptor ocurre de manera normal, no obstante, se pueden presentar diversos panoramas celulares que inhiba las expresión del receptor como en 1) donde el promotor se encuentra metilado llevando a una compactación de la cromatina, aunada a esta modificación se suman la pérdida de activadores transcripcionales como el caso de ERBF-1, a su vez un ADN metilado es reconocido por las enzimas histonas desacetilasas (HDAC1 y HDAC2) que aunada a diversas proteínas represoras como mSin3A y MeCP2 favorecen un remodelamiento de la cromatina, repercutiendo finalmente en la pérdida de la expresión del receptor de estrógenos. 2) Por otro lado, en un panorama celular en donde se pierde la unión de los activadoras transcripcionales aún sin un promotor metilado, no se lleva a cabo la transcripción del gen codificante del receptor de estrógenos alfa.

A continuación se muestra una tabla de los factores de regulación genética que se presumen están implicados en los diferentes niveles de expresión del receptor a estrógenos alfa ($ER\alpha$).

Tabla 1. Factores que se han visto implicados en la regulación de la expresión del Receptor de Estrógenos alfa ($ER\alpha$)

Factores de regulación de expresión génica	Características	Función sobre $ER\alpha$
ERBF-1	Factor transcripcional que se une a un elemento <i>cis</i> en una región cerca del inicio de la transcripción	Activación
DNMT-1	DNA metiltransferasa (adiciona un grupo metilo) de zonas ricas en CpG	Represión
HDAC1	Histona desacetilasa (remoción de un grupo acetilo) principalmente de las histonas H3 y H4	Represión
mSin3A	Corepresor que es componente central de un complejo de remodelación de la cromatina, que es reclutado por varios represores transcripcionales. Además posee actividad de HDAC1	Represión
MeCP2	Proteína de unión a CpG metilada. La cual puede reclutar a otras proteínas para llevar a cabo represión transcripcional	Represión
Suv39H1	Metiltransferasa de la lisina en H3. Además, juega un papel crucial en la organización de la heterocromatina	Represión
p300	Proteína coactivadora que tiene función acetiltransferasa	Activación
pRb2/p130	Proteína supresora tumoral que se asocia a complejos remodeladores de la cromatina	Represión
E2F4/5	Miembro de la familia de factores transcripcionales que se encargan del control del ciclo celular. Muestra interacción con HDACs	Represión

1.8 Técnicas para el análisis de la regulación transcripcional

El genoma humano es un almacén vasto pero crítico de información, su cerca de tres mil millones de nucleótidos codifican ya sea directa o indirectamente las instrucciones para la síntesis de casi todas las moléculas que forman cada célula. La secuenciación del genoma proporcionó con alta precisión las secuencias de ADN para cada uno de los 24 cromosomas, no obstante, en la actualidad se tiene una comprensión incompleta de las porciones codificantes de proteínas, así como de las transcripciones no codificantes y elementos genómicos que temporal y espacialmente regulan la expresión génica (International Human Genome Sequencing Consortium., 2004).

Los mecanismos moleculares por los cuales la información genómica dirige la síntesis de diferentes biomoléculas ha sido el centro de gran parte de la biología molecular en los últimos tres decenios. Un reto importante en la biología es identificar los elementos reguladores de la transcripción que controlan la expresión de cada gen, su funcionamiento y coordinación de cada uno de estos para ejecutar procesos celulares complejos. En general, la regulación de la transcripción implica la interacción de múltiples componentes, por lo que la disponibilidad de factores específicos de transcripción y la accesibilidad de las regiones genómicas definidas determinan si la transcripción de una región se lleva a cabo o no. Sin embargo, la visión actual de la regulación transcripcional es excesivamente simplificada, con muchos detalles que quedan por establecer (Maston., *et al.* 2006).

Para entender la regulación transcripcional se ha implementado un catálogo de herramientas, centrado en la unión de proteínas reguladoras y en la estructura de la cromatina; dentro de las cuales destaca: la inmunoprecipitación de la cromatina (*ChIP*), *ChIP-chip* y *ChIP-PET*, en donde se utilizan anticuerpos específicos para identificación de complejos nucleoproteicos. Este ADN obtenido puede ser analizado usando ya sea microarreglos (*ChIP-chip*) o secuenciación de alto rendimiento (*ChIP-PET*). Estas técnicas en principio incluyen al menos 18 factores y componentes generales de la transcripción, por ejemplo, la ARN polimerasa II, TAF1 y TFIIB. A continuación se muestran las técnicas

utilizadas actualmente para el estudio de la regulación transcripcional (Ren., *et al.* 2000; The ENCODE Project Consortium, 2007; The ENCODE Project Consortium, 2012)

Tabla 2. Técnicas utilizadas para analizar la regulación transcripcional.

TÉCNICA	DESCRIPCIÓN
ChIP-chip	Utilizada para investigar las interacciones entre proteínas y ADN <i>in vivo</i> . Permite la identificación de cistromas a gran escala génica. Su objetivo es localizar sitios de unión de proteínas que puedan ayudar a identificar regiones funcionales en el genoma.
CAGE	Captura del capuchón metilado en el extremo 5' del ARN, seguida de la secuenciación de alto rendimiento de una pequeña etiqueta adyacente al capuchón. Usado para determinar el sitio preciso de inicio de la transcripción en el genoma.
RNA-PET	Captura simultánea del ARN junto con el capuchón metilado y la cola de poli A, indicativo de un ARN mensajero completo. Una vez obtenido el ARN, una pequeña etiqueta que cada extremo se somete a secuenciación de alto rendimiento. Ayuda a identificar sitios alternativos de inicio de la transcripción.
ChIP-seq	Inmunoprecipitación de la cromatina seguida de secuenciación. Se utiliza para identificar regiones específicas de la cromatina unidas a proteínas, las cuales son identificadas por anticuerpos específicos dirigidos hacia epítipo blanco. La muestra obtenida se somete a secuenciación de alto rendimiento para determinar las regiones del genoma que están unidas a las proteínas de interés. Generalmente se utilizan anticuerpos dirigidos a epítopos asociados a la cromatina incluyendo: factores de transcripción, proteínas de unión a la cromatina y modificaciones químicas específicas sobre las histonas.
DNaseI-seq	Basada en el corte obtenido por la enzima DNase I, la cual corta preparaciones de cromatina <i>in vivo</i> en sitios de unión específicos de proteínas (no-histonas) cercanos. Los cortes resultantes son

	secuenciados para determinar aquellos sitios sensibles a DNAsa I que corresponden a cromatina abierta. Esta técnica es utilizada para determinar sitios de inicio de la transcripción.
FAIRE-seq	Esta técnica se fundamenta en el aislamiento de elementos regulatorios asistido por formaldehído, se obtienen regiones genómicas carentes de nucleosomas para explorar la diferencia entre regiones con alta concentración de nucleosomas en comparación con aquellas regiones con baja concentración correspondiente a secuencias específicas de regulación. Los elementos obtenidos son secuenciados para su identificación.
ChIP-cloning o ChIP transitorio	Los fragmentos inmunoprecipitados pueden ser clonados en un vector y ser secuenciados o marcados fluorescentemente y ser hibridado a un arreglo de ADN enriquecido con promotores
ChIP-STAGE	Ensayo ChIP unido a secuenciación de alto rendimiento. Usada para estudio de redes de regulación de factores transcripcionales.
ChIP-PET	La cromatina unida a proteína es enriquecida en un ChIP-chip. Las secuencias enriquecidas son clonadas aleatoriamente en un vector, donde el inserto es flanqueado por un sitio de restricción tipo II (MmmI). La liberación del inserto con la secuencia de restricción de la enzima son subclonados en otro plásmido.

- ChIP-chip: Inmunoprecipitación de la cromatina unida a microarreglos.
- CAGE: Análisis de la expresión génica por capuchón.
- RNA-PET: Secuenciación de ARNm mediante etiquetas unidas en sus extremos.
- ChIP-seq: Inmunoprecipitación de la cromatina unida a secuenciación.
- DNase-seq: Digestión enzimática con DNAsa I unida a secuenciación.
- FAIRE-seq: Aislamiento de elementos regulatorios asistido por formaldehído unido a secuenciación
- ChIP-cloning, ChIP transitorio: Inmunoprecipitación de la cromatina unida a plásmidos o episomas.
- ChIP-STAGE: Inmunoprecipitación de la cromatina para el análisis de secuencias de etiquetas enriquecidas genómicamente.
- ChIP-PET: Inmunoprecipitación de la cromatina de secuencias enriquecidas con etiquetas en los extremos.

Los procesos biológicos como la transcripción genética, replicación de ADN, recombinación, reparación de ADN, segregación cromosómica, estabilidad cromosomal, progresión del ciclo celular, silenciamiento epigenético y la regulación de la expresión génica están mediados a través de las interacciones proteína-ADN.

Las técnicas comúnmente utilizadas para caracterizar las interacciones entre proteínas y ADN son EMSA, footprinting DNAasa y las variantes de la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). A pesar de la información obtenida acerca de la regulación transcripcional con las técnicas mencionadas anteriormente, éstas tienen sus limitaciones, dificultando la identificación de proteínas con actividad reguladora.

El ensayo de cambio de movilidad electroforética o EMSA: es un método rápido y sensible para la identificación de las interacciones entre una proteína y ADN, sin embargo, las muestras que son sometidas a dicho procedimiento se encuentran fuera de su equilibrio químico durante la electroforesis, brindando una visión sesgada de lo que podría estar ocurriendo en el ambiente celular. De igual modo, se ha observado que al utilizar esta metodología varios complejos son más estables en el gel que en solución libre, favoreciendo interacciones que probablemente no ocurran de manera natural (Gade and Kalvakolanu., 2012). Además en el ensayo de EMSA usan pequeñas sondas de oligonucleótidos que no son óptimas para el estudio de asociación de complejos proteicos con el ADN que requieran de factores secundarios (Lavrrar and Farnham., 2004).

La inmunoprecipitación de la cromatina o ChIP en un proceso con múltiples pasos y cada paso debe de ser estandarizado para obtener óptimos resultados. Este ensayo permite una observación imparcial sobre los cambios que ocurren en la cromatina en respuesta a señales extracelulares, durante la diferenciación y desarrollo, en donde el reclutamiento de las proteínas reguladoras hacia el ADN es dinámico. En este procedimiento las células intactas son sometidas a una exposición con formaldehído para inducir la unión covalente entre la proteína y ADN o proteína-proteína, que podría alterar las funciones e interacciones proteicas. Los complejos proteína-ADN son cortados mecánica o enzimáticamente y recuperados por inmunoprecipitación, para posteriormente ser analizados mediante PCR. El principal inconveniente de la técnica de ChIP es su inherente variabilidad, debido a la

mutabilidad del entrecruzamiento con formaldehído, la inmunoprecipitación o la eficiencia del lavado del complejo proteína-ADN, por lo que se debe de tener un riguroso control sobre las condiciones experimentales. Otra restricción incluye la dependencia sobre la disponibilidad de anticuerpos altamente específicos así como la necesidad de altos niveles de expresión de la proteína de interés y de una alta tasa de interacción proteína-ADN. Por otro lado, se encuentra la dificultad para el manejo de una amplia población de proteínas en donde la proteína de interés se expresa en bajos niveles (Gade and Kalvakolanu., 2012).

Para evitar este tipo de inconvenientes se debe de optimizar: 1) El tiempo de fijación con formaldehído, el cual debe de ser específico para cada anticuerpo a utilizarse, 2) La cantidad de proteína a analizar, lo cual se debe de comprobar por ensayos de *Western blot* y 3) La cantidad de anticuerpo usado, ya que la calidad y especificidad de un anticuerpo contribuye radicalmente al resultado obtenido.

Además, los controles positivos y negativos son absolutamente necesarios para la correcta interpretación de los datos obtenidos por ChIP, los cuales son difíciles de obtener debido a que se debe de conocer al menos un gen que interactúe con el factor de transcripción de interés para que funcione como control positivo. Para control negativo, las células que no expresan el factor de interés son de gran ayuda, pero se debe de asegurar la nula expresión del factor, ya que una proteína parcialmente funcional podría unirse al ADN y consecuentemente obtener una mala interpretación de los resultados (Gade and Kalvakolanu., 2012).

Con el objetivo de eliminar las variables y direccionar los ensayos de ChIP, se desarrollaron nuevas variantes de ChIP para la identificación *in vivo* de sitios de unión para factores de transcripción que se unen al ADN de forma directa (mediante su dominio de unión a ADN) o indirecta (como un coactivador o corepresor). Dicha técnica es conocida como *ChIP-cloning* o *ChiP transitorio*, en donde los fragmentos inmunoprecipitados pueden ser clonados en un vector y ser secuenciados o marcados fluorescentemente para ser hibridados a un microarreglo de ADN enriquecido con promotores. Para realizar *ChIP-cloning* se puede utilizar al menos 3 métodos diferentes para determinar cuáles son los

nucleótidos que son requeridos para la unión *in vivo*: 1) Transfección transitoria, 2) Integración estable y 3) Episomas. La utilización de un método u otro depende de los requerimientos de la investigación, ya que se puede optar por la transfección transitoria que es el método más fácil y rápido en comparación con la integración estable y los episomas, pero sí se necesita clonar fragmentos de ADN de mayor tamaño el episoma sería la mejor opción. Cada uno de estos métodos tiene sus limitantes, ya que el uso de vectores tienen que ser manejado de forma estricta para mantener el número adecuado de copias del vector con el objetivo de optimizar los ensayos de PCR, de igual modo, la integración estable podría ocasionar diversos efectos sobre el sitio de integración. Por otro lado, el uso de episomas requiere de líneas celulares compatibles, además el tamaño del episoma puede ocasionar dificultades para su introducción a la célula hospedera. (Wells and Farnham., 2002). No obstante, la mayor ventaja de esta técnica es que las proteínas unidas al promotor de interés y no a otros promotores celulares pueden ser purificadas específicamente.

Una variante de *ChIP-cloning*, permite conocer que dominio de la proteína interactúa directamente con el ADN, ya que se realizan diversas construcciones que contengan los diferentes dominios mutados, dichas construcciones debe de tener una etiqueta como por ejemplo hemaglutinina (HA), ya que un anticuerpo dirigido contra la etiqueta podría utilizarse para realizar el ensayo de ChIP, y así evitar una competencia de unión entre la proteína exógena y endógena. Para evadir este tipo de inconvenientes se aconseja inhibir o disminuir la expresión de proteína nativa, lo que significaría realizar más procedimientos experimentales que implicarían mayor costo y consumo de tiempo. Además, se aconseja que este tipo de ChIP se debe de acompañar de células que provengan de animales mutantes en ambos alelos para la proteína de interés o utilizar células que contienen bajos niveles de expresión de la proteína silvestre, con la finalidad de evitar una mala interpretación de los datos obtenidos por ChIP (Wells and Farnham., 2002).

Los iniciadores requeridos para el análisis de PCR en *ChIP-cloning* deben de ser elegidos cuidadosamente para amplificar solo la construcción y no el *loci* endógeno. Para las células que contienen los plásmidos, se debe de diseñar un iniciador que hibride con la secuencia insertada y otro que se una a la secuencia propia del vector. De igual modo, se

pueden generar iniciadores que hibriden entre la unión del inserto con el plásmido o si se obtuvo una línea celular estable se deben de diseñar oligonucleótidos que hibriden con el gen reportero y el inserto.

En la actualidad, los reportes en donde se ha utilizado la técnica *ChIP-cloning* o *ChIP transitoria*, han usado anticuerpos contra factores transcripcionales conocidos, basándose en los análisis bioinformáticos y ensayos experimentales previos que sugieren la interacción de los factores transcripcionales con los promotores de interés. Además, para realizar ésta variante de ChIP, las líneas que utilizaron eran altamente transfectables y de fácil manejo para los ensayos de ChIP, asimismo contenían el factor de transcripción de interés, ya que se observó que la sobreexpresión del factor de transcripción podría resultar en falsos positivos (Lavrrar and Farnham., 2004). Aunado a esto, se debe tener un conocimiento apropiado acerca de las posibles proteínas que podrían estar interactuando con la secuencia reguladora ya que no se pueden realizar ensayos de ChIP con anticuerpos dirigidos a proteínas que podrían estar involucradas en interacciones putativas, por lo que se descarta este método para analizar posibles interacciones no evaluadas con anterioridad (Lavrrar and Farnham., 2004). Aunque las interacciones putativas podrían ser evaluadas por ciertos programas bioinformáticos, estos pueden arrojar datos que podrían llevar a una falsa identificación, ya que mucha de la información disponible se basa en datos referentes a los sitios consenso de unión.

La combinación de ChIP con un ensayo de *Western blot* permitiría la identificación de interacciones proteicas que solo ocurren sobre el ADN y no en solución. La desventaja es que esta técnica no permite la determinación en cuanto a cuál era la secuencia a la que se encontraba unida la interacción proteína-proteína. No obstante, una vez detectada una interacción positiva, el sitio de unión específico puede ser determinado por un ChIP estándar para determinar si la interacción proteica identificada por *Western blot* ocurrió en el sitio génico de interés. Otra limitante que se tiene en ésta fusión de técnicas, es que las diversas interacciones proteína-proteína que pueden ser detectadas están restringidas debido al número de anticuerpos potenciales que pueden ser evaluados (Wells and Farnham., 2002).

Este tipo de variaciones inherentes a la técnica de ChIP y sus variantes, pueden ser evitadas utilizando un anticuerpo dirigido únicamente contra una proteína exógena conocida, precipitando solamente el complejo proteína-DNA que está fusionado a la proteína exógena, de este modo se evitaría cualquier competencia de unión con alguna proteína endógena que estuviera interactuando con alguna secuencia de ADN, ya que la unión de la proteína endógena podría retrasar y sesgar el análisis de los perfiles proteicos obtenidos. Además, se debe de tomar en cuenta que la unión de las proteínas al ADN puede ser influenciado por la fase del ciclo celular, la concentración relativa de otras proteínas o durante el desarrollo tumoral. Cabe destacar que no todos los anticuerpos disponibles comercialmente tienen la calidad para ser utilizados en ensayos de ChIP, lo que se reflejaría en la eficiencia de la inmunoprecipitación.

Por otro lado, una correcta interpretación de los resultados sería más eficiente al generar controles que fuera externos al contenido endógeno celular, como lo sería la transfección de plásmidos que contengan secuencias y genes reporteros provenientes de otros organismos los cuales pueden ser evaluados de forma cuali y cuantitativamente. Las secuencias al ser originarias de otros organismos evitarían en sesgo y los falsos positivos asimismo favorecerían la generación de controles.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

En el modelo actual, la transcripción diferencial de genes se asocia a un cambio en la composición proteica de la cromatina. Un claro ejemplo de esta variación de distribución proteica se manifiesta en la falta de expresión del receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$) en pacientes diagnosticadas con la forma triple negativa de cáncer de mama (carentes de los receptores HER-2-, PR β - y $ER\alpha$ -) de los cuales cerca de un 30% no responden a ningún tratamiento establecido, lo que se interpreta como un reflejo en la heterogeneidad de los mecanismos genéticos-moleculares que se organizan, presentan y actúan de forma específica y distintiva en cada paciente. La diferencia entre la presencia y/o ausencia de factores o proteínas involucradas en el silenciamiento del gen codificante del $ER\alpha$ podría funcionar como firma biológica para la separación intragrupal de pacientes con cáncer de mama triple negativo (HER-2-, PR β - y $ER\alpha$ -). Sin embargo, en la actualidad, las técnicas utilizadas para el estudio comparativo en la variación del revestimiento proteico de la cromatina, se limitan a metodologías que brindan un panorama general, además dichas técnicas requieren obligatoriamente del conocimiento previo de al menos uno de los elementos reguladores asociados a la cromatina correspondiente al locus de interés, por lo que diversos grupos de investigación han concluido que dicha problemática requiere del desarrollo de nuevas herramientas de análisis proteico. Con lo anterior se planteó la siguiente pregunta: ¿Es posible generar un sistema plasmídico tipo “presa-anzuelo” que permita el estudio del revestimiento proteico de la cromatina de un locus específico, como la región promotora del $ER\alpha$?

3. JUSTIFICACIÓN:

En la actualidad, el análisis comparativo de la composición de la cromatina es restringido. La técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) permite el estudio de interacción de proteínas y ADN, siempre y cuando exista un anticuerpo dirigido a una proteína particular. Hasta el momento no es posible analizar la composición proteica de la cromatina de una secuencia específica, como por ejemplo la región promotora del receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$). Una herramienta de este tipo permitiría estudiar el revestimiento

proteico de una región genómica específica. Los perfiles proteicos obtenidos mediante esta herramienta contribuirían a la identificación de marcadores moleculares específicos, lo que podría aplicarse para la identificación de subgrupos de pacientes diagnosticados con cáncer de mama triple negativo (carentes de Her-2, ER α , PR β).

4. HIPÓTESIS:

Es posible generar ADN recombinante que contengan un locus específico humano y diversas secuencias reporteras exógenas cuya expresión proveería la base genética de un sistema tipo “presa-anzuelo” para la recuperación nativa del ADN recombinante a partir de un ambiente endógeno celular hospedero y así facilitar el análisis del revestimiento proteico de su cromatina.

5. OBJETIVOS:

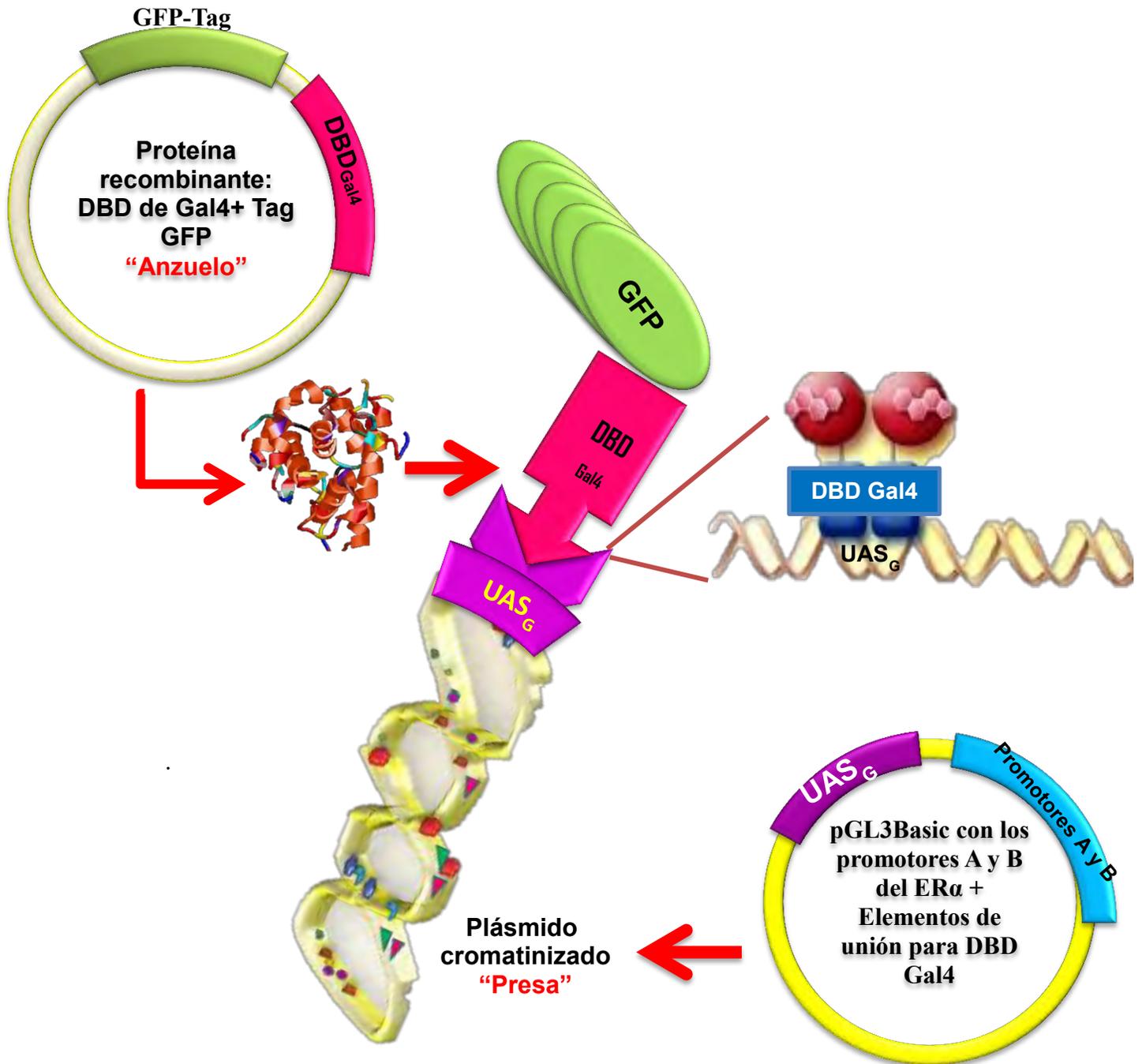
5.1 General:

- Generar la base genética de un sistema tipo “presa-anzuelo” para la recuperación de la forma nativa de plásmidos transfectados en HEK-293T.

5.2 Particular:

1. Amplificar y clonar el locus del promotor A y B del receptor de estrógenos alfa en el vector pGL3Basic que contiene luciferasa como gen reportero.
2. Amplificar y clonar la secuencia del dominio de unión a ADN del factor transcripcional de Gal4 de levadura en el sistema de expresión de GFP: pcDNA3.1/NT-GFP.
3. Transfectar las construcciones obtenidas en la línea celular HEK-293T.
4. Evaluar la expresión del gen reportero de la luciferasa.
5. Comprobar la expresión de la proteína recombinante DBD-GFP.

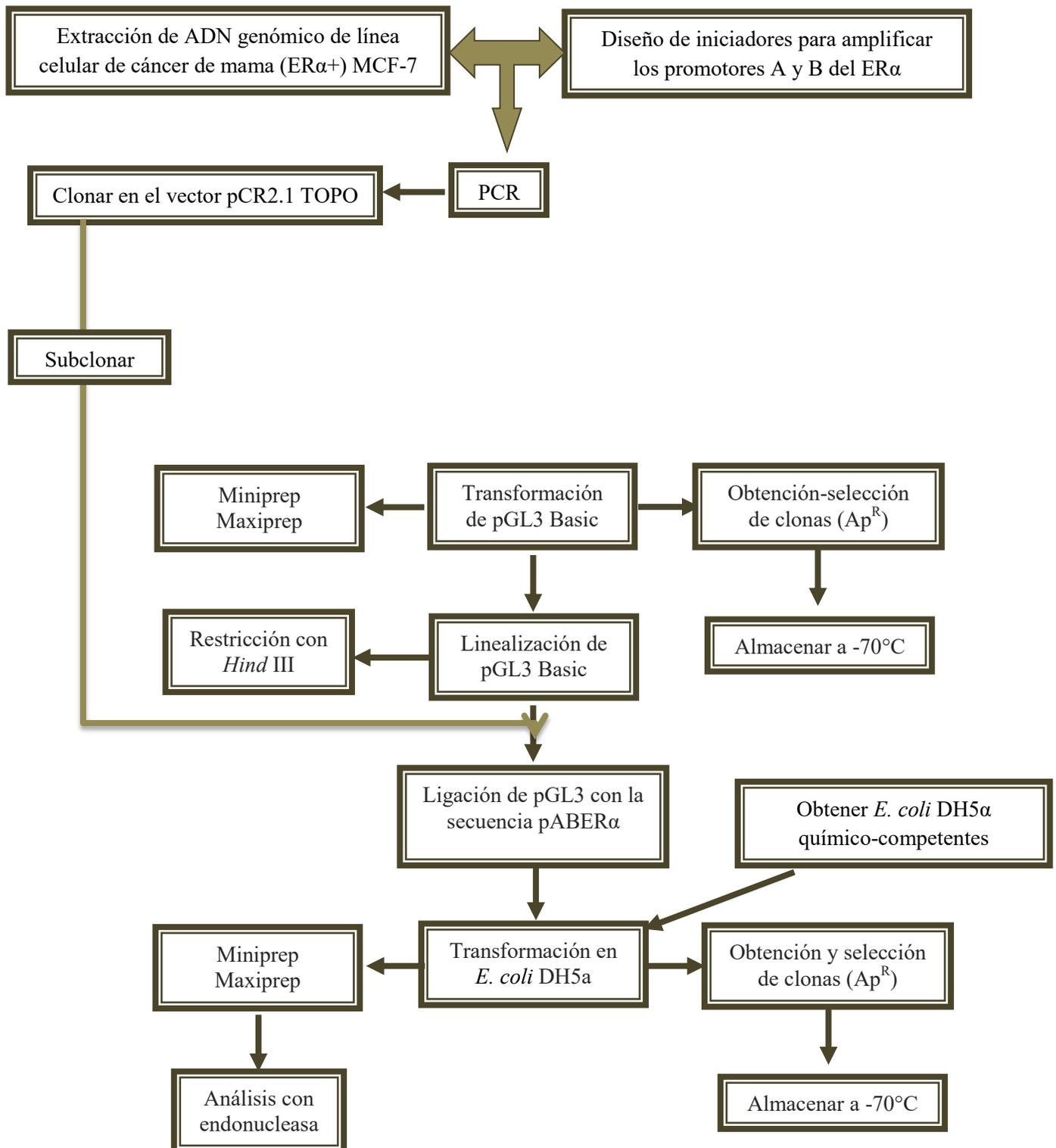
ESQUEMA DEL FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA A DESARROLLAR

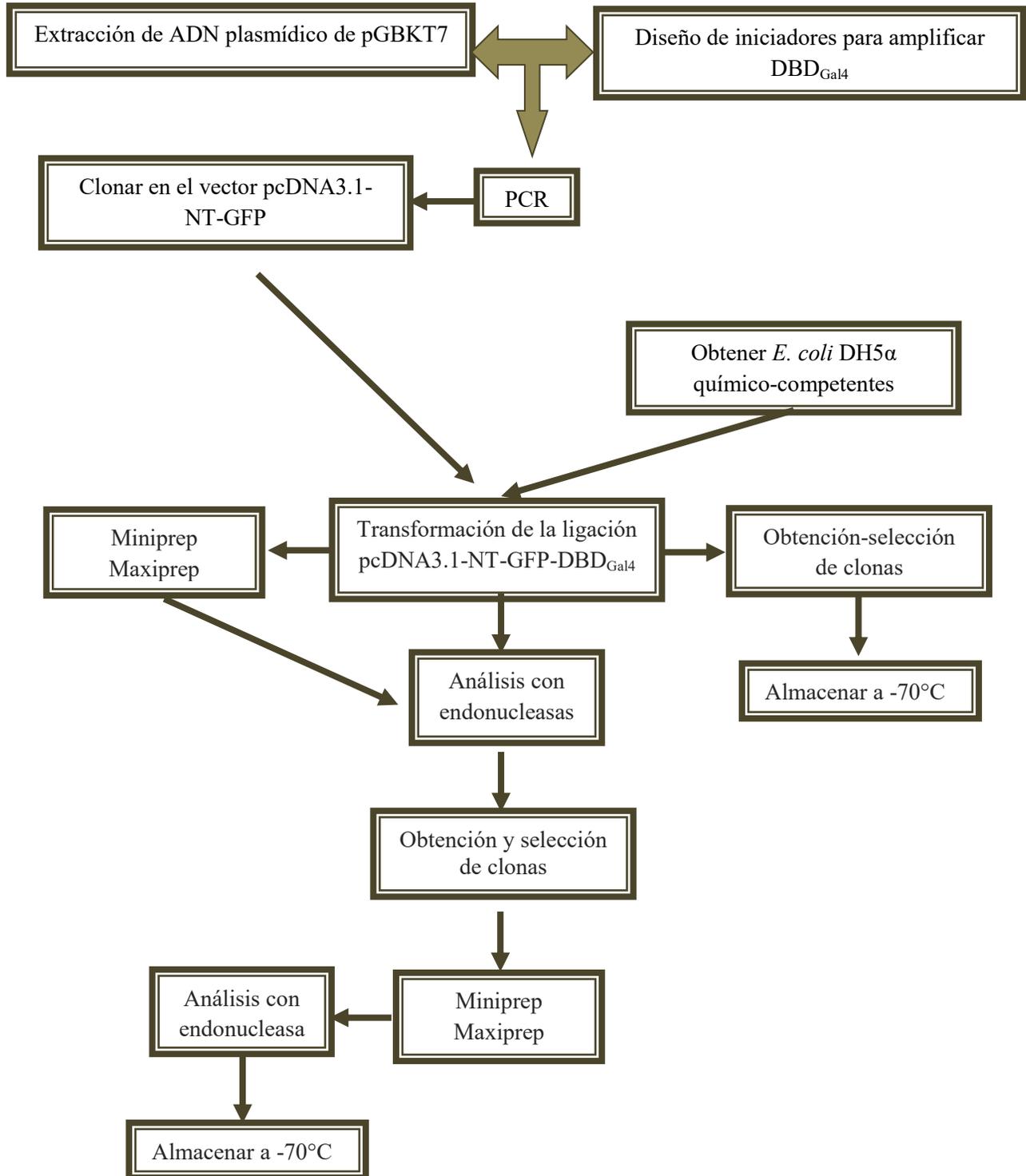


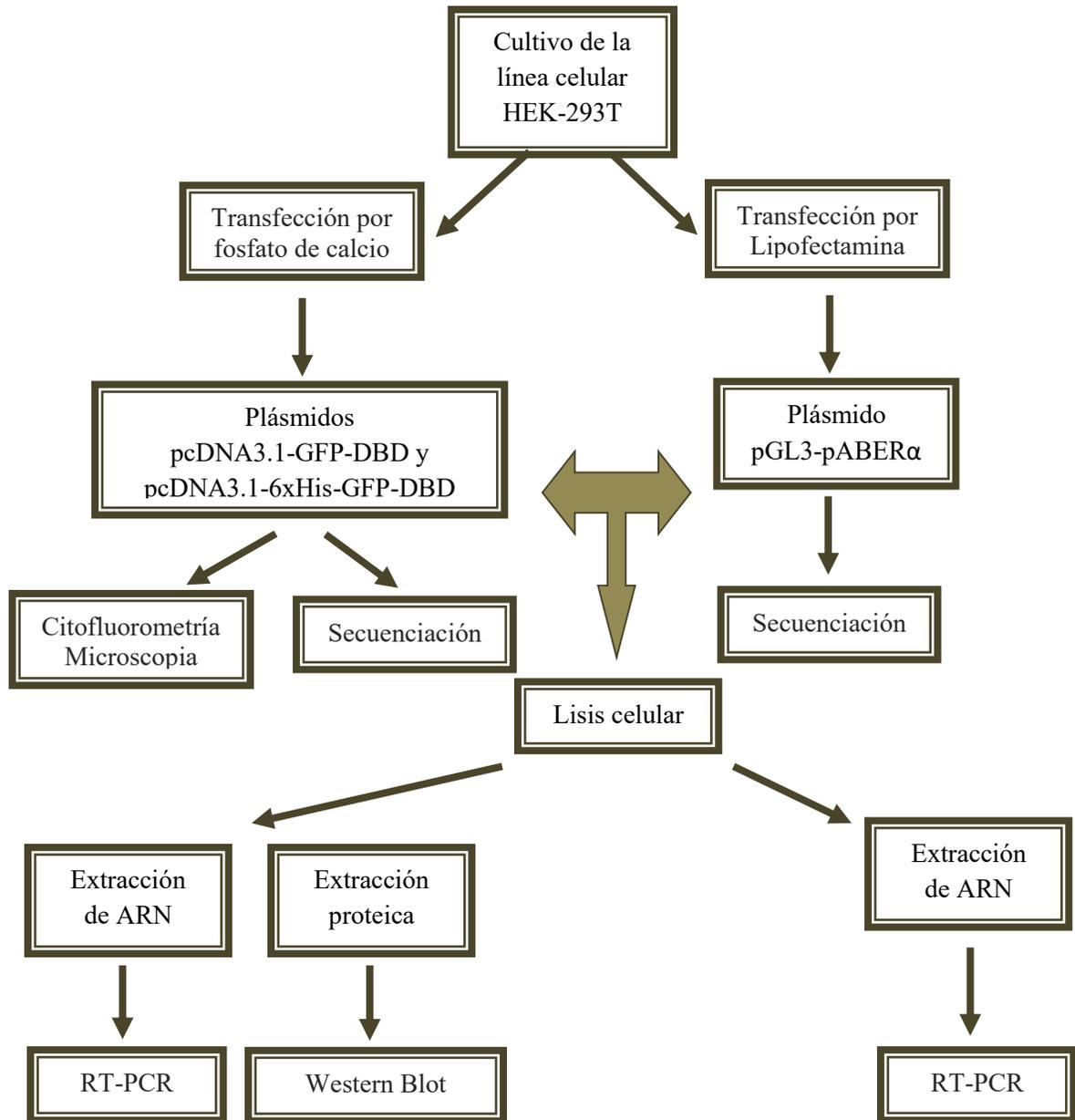
Se busca generar un plásmido de expresión que contenga la secuencia del dominio de unión a ADN del factor transcripcional Gal4 (DBD_{Gal4}) de levadura fusionada a una secuencia de GFP para producir una proteína recombinante "anzuelo" GFP-DBD, la cual reconocerá a los elementos de unión (secuencias consenso de unión de Gal4) que se encontrarán insertos en un plásmido "presa" que a su vez tendrá clonada la secuencia de los promotores A y B del receptor de estrógenos alfa (ER α). El complejo de unión proteína "anzuelo" GFP-DBD + plásmido "presa" se purificará a través de anticuerpo dirigido contra GFP. UAS_G: Elementos de respuesta o unión de Gal4, DBD: Dominio de unión a ADN de Gal4, GFP: Proteína verde fluorescente.

6. METODOLOGÍA:

Objetivo 1:



Objetivo 2:

Objetivo 3, 4 y 5:

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Material biológico

LINEA CELULAR	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
HEK-293T	Línea celular altamente transfectable derivada de túbulo distal embrionario humano. Competente para replicar vectores que contienen la región promotora SV40. Ampliamente usada para la producción retroviral, génica y proteica.	www.atcc.org/products/all/CRL-3216 .
MCF-7	Derivada de un sitio metastásico de cáncer de mama (derrame pleural). Conserva varias características del epitelio mamario diferenciado incluyendo la capacidad para procesar estradiol a través de los receptores de estrógeno citoplasmáticos y la capacidad de formación de cúpulas. Expresan el oncogén WNT7B.	www.atcc.org/products/all/HTB-22 .

CEPA	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
<i>Escherichia coli</i> DH5a	Cepa no patógena, diseñada para clonaciones. Contiene múltiples clonaciones que facilita su alta eficiencia de transformación. Las mutaciones incluyen: ΔlacZΔ M15: selección de clonas recombinante, RecA1: reduce la recombinación homóloga y EndA1: baja degradación por endonucleasas	Hanahan. 1983

PLÁSMIDOS COMERCIALES	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pCR2.1TOPO	Vector de clonación para la inserción directa de productos PCR amplificados con polimerasa Taq en un vector plasmídico para subclonación. Contiene sitios de restricción para subclonación.	Thermo Fisher Scientific*, No. Cat.: K4500-01
pGL3 Basic	Vector de clonación que proporciona una base para el análisis cuantitativo de factores (promotores, potenciadores, factores de unión a ADN, etc.) que regulan la expresión de genes de mamíferos. Contiene una región de codificación modificada para luciferasa que permite el seguimiento de la actividad transcripcional en las células eucariotas transfectadas	Promega Corporation*, No. Cat.: E1751
pGL3 Control	Vector con luciferasa como reportero	Promega Corporation*, No. Cat.: E1741
pcDNA3.1 NT-GFP TOPO	Vector de clonación que permite la fusión de una proteína de interés a la proteína GFP Ciclo 3. Diseñado para la expresión transitoria o estable	Thermo Fisher Scientific*, No. Cat.: K481001

	de las proteínas fusionadas a GFP en una amplia gama de células de mamíferos.	
pGBKT7	Vector que expresa las proteínas fusionadas a los aminoácidos 1 a 147 del dominio de unión a ADN del factor transcripcional Gal4 (DBD), además contiene una etiqueta del epítipo c-Myc.	Clontech Laboratories, Inc. A Takara Bio Company*, No. Cat.: 630489
PLÁSMIDOS GENERADOS	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pCR2.1-pAERα	Vector que contiene la secuencia del promotor A del receptor de estrógenos alfa (ER α)	En este trabajo
pCR2.1-pBERα	Vector que contiene la secuencia del promotor B del receptor de estrógenos alfa (ER α)	En este trabajo
pCR2.1-pABERα	Vector que contiene las secuencias de ambos promotores AB del receptor de estrógenos alfa (ER α)	En este trabajo
pGL3-pABERα	Contiene las secuencias de ambos promotores AB del receptor de estrógenos alfa (ER α) en el vector de expresión pGL3.	En este trabajo
pcDNA3.1-GFP-DBD	Vector de clonación pcDNA3.1 que contiene la secuencia DBD para generar la proteína de fusión con GFP (expresión en líneas celulares de mamíferos).	Science Exchange* En este trabajo
pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD	Vector de clonación pcDNA3.1 que contiene la secuencia DBD para generar la proteína de fusión con GFP (expresión en líneas celulares de mamíferos). Además alberga una etiqueta 6x His.	Science Exchange* En este trabajo

*Thermo Fisher Scientific: Carlsbad, CA, EUA.

*Promega Corporation: Madison, WI, EUA.

*Clontech Laboratories, Inc. A Takara Bio Company: Mountain, CA, EUA.

*Science Exchange-ProNovus Bioscienc, LLC: Mountain, CA, EUA.

7.2 Condiciones de Cultivo

Líneas celulares

Las células de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 (ATCC, Manassas, VA, EUA) se mantuvieron en medio RPMI-1640 (Invitrogene Life technologies, Grand Island, NY, EUA, No. Cat. 31800022) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Cellgro Corning, Masassas, VA, EUA, No. Cat. 35-010-CV), penicilina 100 $\mu\text{g/ml}$ (GIBCO[®], Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. 15240), estreptomycin 100 $\mu\text{g/ml}$ (GIBCO[®], Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. 15240) y anfotericina-B 0.25 $\mu\text{g/ml}$ (GIBCO[®], Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. 15290-018) a 37 °C con humedad relativa saturante y 5 % de CO₂. La línea celular derivada de túbulo

distal embrionario humano HEK-293T (donada por el Dr. Luis Covarrubias Robles, IBT, UNAM) fue cultivada en medio DMEM “*Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium*” (MP-Biomedicals, LLC, OH, EUA, No. Cat. 1033120) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Cellgro Corning, Masassas, VA, EUA, No. Cat. 35-010-CV), penicilina 100 µg/ml (GIBCO[®], Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. 15240), estreptomina 100 µg/ml (GIBCO[®], Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. 15240) y anfotericina-B 0.25 µg/ml (GIBCO[®], Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. 15290-018) a 37 °C con humedad relativa saturante y 5 % de CO₂.

Cultivo bacteriano

Las cepas de *E. coli* DH5α transformadas con los plásmidos empleados en este trabajo, fueron crecidas en medio líquido Luria-Bertani (“*LB-Broth*”, SIGMA-ALDRICH[™], INC, MO, EUA, No. Cat. 117K0091), incubadas en agitación a 250 rpm a 37 °C durante 16 h. El antibiótico empleado en los medios de cultivo fue ampicilina (GIBCO[®], Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. A-9518) a una concentración de 100 µg/ml. La cepa de *E. coli* DH5α que contiene al plásmido pGBKT7 fue crecida en medio líquido LB con kanamicina (GIBCO[®], Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. 11815024) a una concentración de 50 µg/ml.

7.3 Extracción de ADN

Genómico:

La extracción del ADN genómico de la línea celular de cáncer de mama MCF-7 se inició cuando el cultivo se encontraba a un 80 % de confluencia celular. Se recuperaron los paquetes celulares del cultivo mediante centrifugación (6000 rpm durante 5 min), el paquete celular obtenido se resuspendió en 500 µl de solución de lisis (10 mM de Tris-HCl pH 8, 100 mM de NaCl, 25 mM EDTA pH 8 y 0.5 % de SDS) complementado con 0.1 mg/ml de proteinasa K y 0.05 mg/ml de RNAsa, la mezcla de reacción se incubó durante 12 h a 55 °C, posterior a la incubación se realizaron extracciones orgánicas consecutivas de fenol saturado/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1 v/v) y cloroformo/alcohol isoamílico (24:1 v/v) según Gong J., *et al.* (1994). La fase acuosa generada fue precipitada con isopropanol adicionado con acetato de sodio 0.3 M y MgCl₂ 10 mM, la muestra obtenida fue almacenada durante 12 h a -20 °C. Finalmente, después del almacenamiento la muestra

se centrifugó a 14000 rpm durante 15min, el pellet conseguido se lavó con etanol al 70 % para a continuación resuspenderlo en agua estéril. La pureza del ADN genómico obtenido fue comprobado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y se determinó la concentración y rendimiento con una lectura espectrofotométrica a 260nm UV (DU-62 - Beckman Coulter, No. Cat. 793218978).

Plasmídico:

Al final de la incubación de 5 ml de cultivos líquidos, se obtuvieron paquetes celulares de las cepas de *E. coli* que contenían los plásmidos pCR2.1 TOPO:pAER α , pCR2.1 TOPO:pABER α , pGL3 Control, pGL3:pABER α , pcDNA3.1 NT-GFP control, pcDNA3.1-GFP:DBD, pcDNA3.1 6x His-GFP:DBD y pGBKT7 mediante centrifugación a 8000 rpm durante 3 min. Posteriormente, se efectuó la extracción de ADN plasmídico mediante el kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega Corporation, Madison, WI, EUA, No. Cat. A1223), de acuerdo a las siguientes especificaciones: 1) Resuspender el paquete celular en 600 μl de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM); 2) Adicionar 100 μl de solución de lisis, mezclar durante 15 seg; 3) Agregar 350 μl de solución neutralizante fría, mezclar por inversión durante 15 seg; 4) Centrifugar a 14500 rpm durante 3 min; 5) recuperar el sobrenadante y transferirlo a la columna de purificación; 6) Agregar 200 μl de solución de lavado removedor de endotoxina; 7) Centrifugar a 14500 rpm durante 15 seg; 8) Agregar 400 μl de solución de lavado ; 9) Centrifugar a 14500 rpm durante 30 seg; 10) Transferir la columna a un tubo de recolección para obtener el ADN; 11) Adicionar de 30-50 μl de agua estéril sobre la columna y dejar incubando 1 min a temperatura ambiente, finalmente centrifugar a 14500 rpm durante 15 seg para obtener el ADN eluido. La pureza del ADN plasmídico fue comprobada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y se determinó la concentración y rendimiento con una lectura espectrofotométrica a 260nm UV (DU-62 - Beckman Coulter, No. Cat. 793218978). Para un mayor rendimiento y concentración de ADN plasmídico se utilizó el kit MAXIPREP-“*Plasmid Maxi*” (QIAGEN®, Hilden, Alemania, No. Cat. 12163), siguiendo las especificaciones del proveedor.

7.4 Diseño de Iniciadores

Partiendo de las secuencias nucleotídicas de los promotores A y B del receptor de estrógenos α (pAER α y pBER α) disponibles en NCBI (Gene ID: 2099, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) se diseñaron pares de iniciadores para la amplificación de los promotores, con un producto de PCR esperado de 300 y 350 pb respectivamente. Como templado para la amplificación de pAER α y pBER α se empleó el ADN genómico de la línea celular MCF-7. Por otro lado, para la amplificación del dominio de unión a ADN del factor transcripcional de Gal4 (DBD_{Gal4}) se recurrió como templado al plásmido recombinante pGBKT7, con base a la secuencia de pGBKT7 se generaron pares de iniciadores para obtener un amplicón de 555 pb.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Características
ESR1-21 HpaI Sentido	GTT AAC GTA CTT AAA GTT GGA GGC CCG	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tamaño: 27 pb ▪ Tm: 67 °C ▪ Contenido de GC: 48 %
ESR1-22 XhoI antisentido	CTC GAC CAG ATG CTT TGG TGT GGA GG	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tamaño: 26 pb ▪ Tm: 70 °C ▪ Contenido de GC: 58 %

Tabla 3. Iniciadores para la amplificación del promotor A del receptor de estrógenos alfa (ESR1).

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Características
ESR1-31 HpaI Sentido	GTT AAC TAT ATC GGA GTC TGG CAC GG	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tamaño: 26 pb ▪ Tm: 65 °C ▪ Contenido de GC: 50 %
ESR1-32 XhoI antisentido	CTC GAG CGG GCC TCC AAC TTT AAG TAC	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tamaño: 27 pb ▪ Tm: 70 °C ▪ Contenido de GC: 56 %

Tabla 4. Iniciadores para la amplificación del promotor B del receptor de estrógenos alfa (ESR1).

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Características
fDBDKpnI sentido	GGT ACC GCC TCC TGA AAG ATG AAG C	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tamaño: 25 pb ▪ Tm: 61.3 °C ▪ Contenido de GC: 52 %
rDBDEcoRV antisentido	GAT ATC CAT GGC CAT ATG CAG GTC CTC	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tamaño: 27 pb ▪ Tm: 62 °C ▪ Contenido de GC: 58 %

Tabla 5. Iniciadores para la amplificación del DBD_{Gal4}.

Para ensayos posteriores de clonación y comprobación de expresión proteica se diseñaron iniciadores para la amplificación de luciferasa, partiendo de la secuencia nucleotídica de pGL3-basic, con un producto esperado de 1.6 Kb. Como templado para la amplificación se empleó el plásmido pGL3-pABER α . De igual modo, se mandó a sintetizar la secuencia de los elementos de respuesta a DBD_{Gal4} (UAS_{Gal4}), con un tamaño de 114 pb, aunado a esta secuencia se diseñó un iniciador que permitió la secuenciación de las clonas obtenidas a partir de la ligación de pGL3-pABER α con los UAS_{GAL4}. La combinación de estos iniciadores se empleó para corroborar que la clonación hubiera ocurrido de manera adecuada.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Características
FLuc23 Sentido	GTA AAG CCA CCA TGG AAG ACG CC	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tamaño: 23 pb ▪ Tm: 60.5 °C ▪ Contenido de GC: 56.5 %
RLuc25 antisentido	CCC GAC TCT AGA ATT ACA CGG CGA T	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tamaño: 25 pb ▪ Tm: 60 °C ▪ Contenido de GC: 52 %

Tabla 6. Iniciadores para la amplificación de Luciferasa.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Características
UAS5xNotI Sintetizado	ACG CGG CCG CCG GAG TAC TGT CCT CCG AGC GGA GTA CTG TCC TCC GAG CGG AGT ACT GTC CTC CGA GCG GAG TAC TGT CCT CCG AGC GGA GTA CTG TCC TCC GGC GGC CGC ACG	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tamaño: 114 pb ▪ Tm: 74.3 °C ▪ Contenido de GC: 68.4 %
UASGalSec21 Secuenciación	ACG CGG CCG CCG GAG TAC T	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tamaño: 19 pb ▪ Tm: 67.1 °C ▪ Contenido de GC: 73.7 %

Tabla 7. Secuencia sintetizada para UAS_{Gal4} y el iniciador para la comprobación de su clonación en pGL3-pABER α respectivamente.

Todos los iniciadores utilizados en este trabajo fueron sintetizados por la empresa IDT “*Integrated DNA Technologies*” (Coralville, Iowa, EUA).

7.5 Condiciones para la amplificación de los promotores A y B del ER α

La amplificación de los promotores se realizó bajo la siguiente mezcla de reacción: concentración de 10-20 ng de ADN, amortiguador 1X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP's 10 mM,

iniciador sentido 0.5 μM , iniciador antisentido 0.5 μM , HotStarTaq DNA polimerasa 2.5 unidades. Las condiciones de amplificación fueron: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min 1 ciclo, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 seg, hibridación (T_m de los iniciadores) a 58 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, extensión a 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min (30 ciclos), 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 1 ciclo, 4 $^{\circ}\text{C}$ infinito (Fig. 10), de acuerdo con el protocolo de manufacturación. La aparición del amplicón de cada promotor se comprobó por medio electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

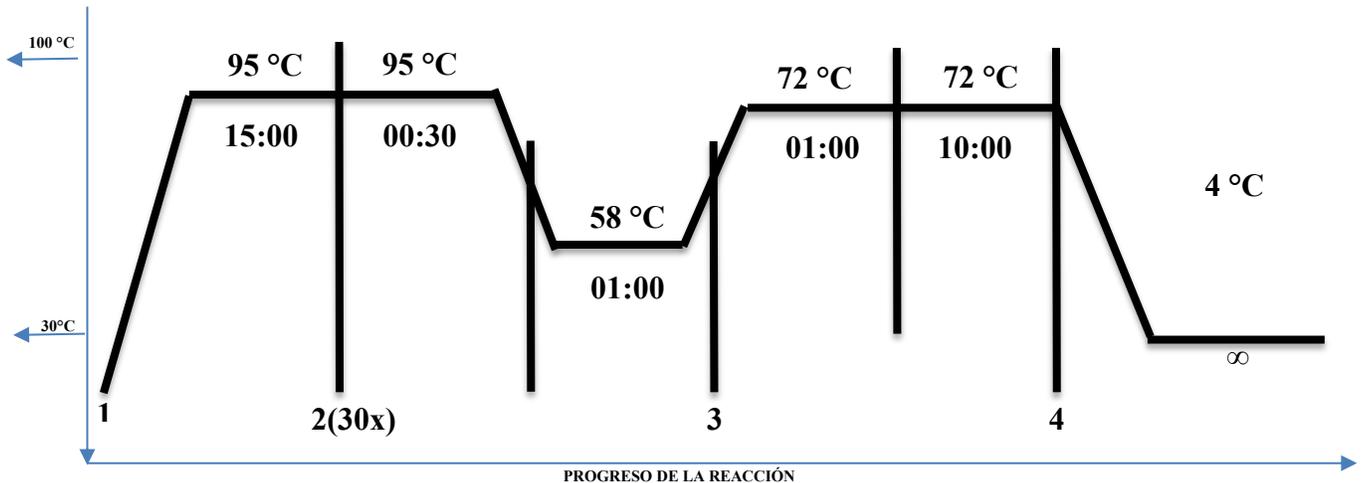


Fig. 1. Esquema de condiciones de PCR para los promotores A y B del Era. Los números en la parte inferior (1-4) corresponden a los pasos del programa generado.

7.6 Condiciones para la amplificación del DBD de Gal4

La amplificación del dominio de unión a ADN de Gal4 a partir del plásmido pGBKT7 se realizó bajo la siguiente mezcla de reacción: concentración de 10-20 ng de ADN, amortiguador 1X, MgCl_2 1.5 mM, dNTP's 10 mM, iniciador sentido 0.5 μM , iniciador antisentido 0.5 μM , HotStarTaq DNA polimerasa 2.5 unidades. Las condiciones de amplificación fueron: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min 1 ciclo, 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 seg, hibridación (T_m de iniciadores) 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, extensión a 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min (30 ciclos), 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min 1 ciclo, 4 $^{\circ}\text{C}$ infinito (Fig. 11), de acuerdo con el protocolo de manufacturación. La aparición del amplicón se comprobó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % teñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

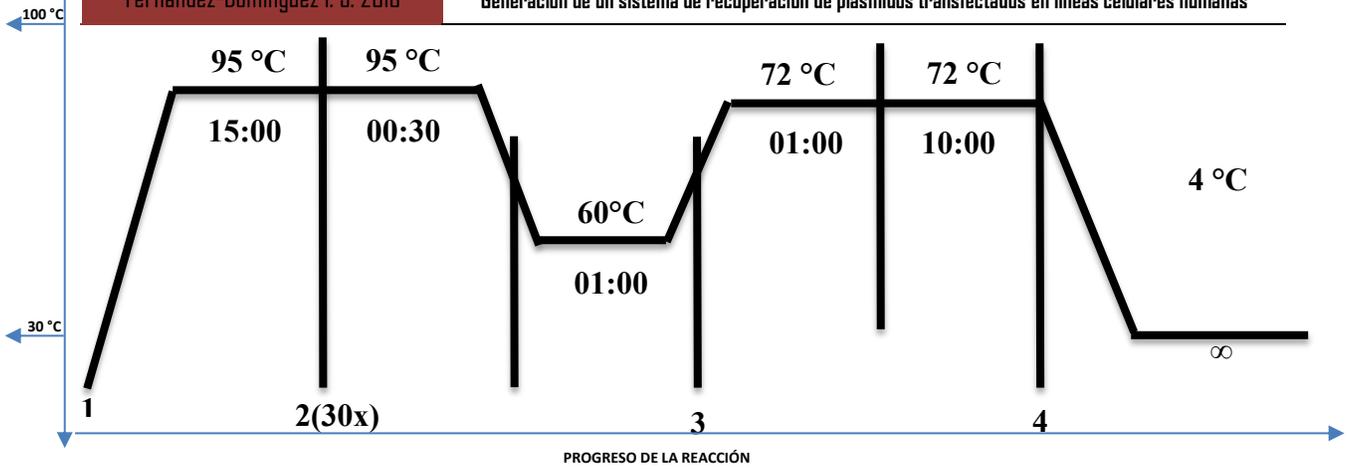


Fig. 11. Esquema de condiciones de PCR para el dominio de unión a ADN de Gal4. Los números en la parte inferior (1-4) corresponden a los pasos del programa generado.

7.7 Condiciones para la amplificación de Luciferasa

La amplificación de luciferasa a partir del ADNc obtenido de HEK-293T transfectadas con pGL3-pABER α , se realizó bajo la siguiente mezcla de reacción: concentración de 10-20 ng de ADN, amortiguador 1X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP's 10 mM, iniciador sentido 0.5 μ M, iniciador antisentido 0.5 μ M, HotStarTaq DNA polimerasa 2.5 unidades. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C 15 min 1 ciclo, 95 °C 30 seg, hibridación (T_m de iniciadores) 60 °C 1 min, extensión a 72 °C 1 min (30 ciclos), 72 °C 10 min 1 ciclo, 4 °C infinito (Fig. 12), de acuerdo con el protocolo de manufacturación. La amplificación de luciferasa se comprobó por medio electroforesis en gel de agarosa al 1.0% teñido con bromuro de etidio (0.5 μ g/ μ l).

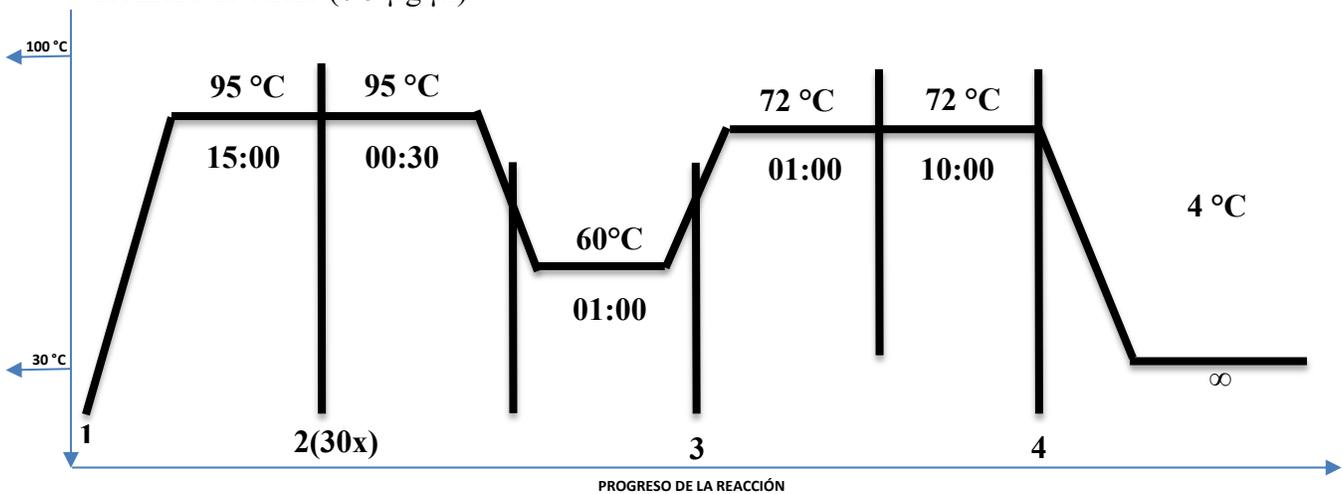


Fig. 12. Esquema de condiciones de PCR para Luciferasa. Los números en la parte inferior (1-4) corresponden a los pasos del programa generado.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue realizada de acuerdo a las especificaciones del proveedor (QIAGEN[®], Hilden, Alemania, No. Cat. 203443), ajustando los tiempos para una amplificación óptima de los productos de PCR.

7.8 Clonación y Ligación

Cada una de las clonaciones y ligaciones efectuadas durante el desarrollo del proyecto se realizaron de acuerdo a Sambrook., *et al* (1989). Las enzimas de restricción utilizadas para obtener clonaciones sitio dirigidas fueron *EcoRI* (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA No. Cat. ER0271), *XhoI* (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA No. Cat. ER0691), *NotI* (New England Biolabs, Inc, MA, EUA, No. Cat. R3005), *EcoRV* (New England Biolabs, Inc, MA, EUA, No. Cat. R0195S) y *KpnI* (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA No. Cat. ER0521), cada una de las enzimas fueron manejadas de acuerdo a las indicaciones de su proveedor, digiriendo entre 250 ng/μl de ADN plasmídico obtenido por Miniprep y hasta 1 μg/μl adquirido a partir de Maxiprep, todas las reacciones de restricción fueron llevadas a un volumen final de 20 μl.

Para efectuar las reacciones de ligación se ocupó el kit de ligación “*Rapid DNA Ligation*” (Roche, MO, EUA, No. Cat. 10716359001) siguiendo las instrucciones del proveedor, las mezclas de reacción fueron llevadas a un volumen final de 30 μl.

7.9 Transformación

Para amplificar los plásmidos que resultaron de las clonaciones, éstos se introdujeron en una célula hospedera apropiada como *E. coli* DH5α previamente sometidas a un tratamiento químico para favorecer un estado competente y así cerciorar la entrada del ADN recombinante. Se empleó el método clásico para generar células competentes que consiste en generar orificios en las membranas celulares, lo cual se consiguió mediante lavados con una solución de CaCl₂ 60 mM, 15 % de glicerol y 10 mM de PIPES (pH 7) aunados a tratamientos físicos, como cambios de temperatura. Las bacterias competentes se generaron de acuerdo al procedimiento descrito por Chung C. T., *et al* (1989). Para la transformación

química se realizó el siguiente procedimiento: 1) Diluir 1 μ l de la ligación obtenida previamente en 20 μ l de agua estéril, 2) Resuspender la mezcla suavemente, 3) Agregar 100 μ l de *E. coli* DH5 α competentes (previamente descongeladas), 4) Incubar la mezcla a 4 °C durante 15 min, 5) Dar choque térmico a 42 °C durante 45 seg, 5) Adicionar 1 ml de medio líquido LB (“LB-Broth”, SIGMA-ALDRICH™, INC, MO, EUA, No. Cat. 117K0091), 6) Incubar 1 h en agitación constante a 250 rpm a 37 °C, y finalmente seleccionar aquellas células portadoras del DNA recombinante utilizado en el proceso, el cultivo bacteriano obtenido se siembra sobre una caja Petri con 30 ml de medio LB sólido suplementado con antibiótico, (“LB-Broth”, SIGMA-ALDRICH™, INC, MO, EUA, No. Cat. 117K0091; Bacto-Agar, DIFCO, Michigan, EUA, No. Cat. 0140-01). Todos los plásmidos empleados en esta tesis excepto el plásmido pGBKT7 codifican para una β -lactamasa que confieren resistencia a ampicilina, de forma que sólo las células que incorporaron dicho vector (con o sin inserto) fueron capaces de crecer en un medio selectivo suplementado con ampicilina a una concentración de 100 μ g/ml (GIBCO®, No. Cat. A-9518). Para el plásmido pGBKT7 se empleó kanamicina (GIBCO®, No. Cat. 11815024) a una concentración de 50 μ g/ml. Las clonas obtenidas fueron analizadas con enzimas de restricción, con reacciones de PCR y por reacciones de secuenciación para la corroboración de su contenido genético.

7.10 Secuenciación

Las construcciones obtenidas fueron secuenciadas en la Unidad de Medicina Genómica y Biología Molecular del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). La secuenciación realizada sobre los plásmidos pGL3-pABER α , pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD se basó en electroforesis capilar mediante secuenciadoras automáticas establecidas en un sistema capilar para hacer la separación de los fragmentos de distinto tamaños. La secuenciación automática por capilares es una alternativa al método de Sanger, que consiste en marcar el iniciador o los terminadores con un compuesto fluorescente que bloquean la posible adición de más nucleótidos. Los productos de la reacción se separan y detectan directamente durante la electroforesis al pasar por delante de un láser que al excitar los fluoróforos permite detectar la fluorescencia emitida. En el caso particular de la Unidad de Medicina Genómica y

Biología Molecular se realiza una reacción única de secuencia en presencia de los cuatro ddNTPs, cada uno de ellos marcados con una sonda fluorescente distinta. Una vez obtenida la reacción, ésta se inyecta en el capilar. Este tipo de secuenciadores se utilizan para lecturas no superiores a unos 450 pb. Las secuencias obtenidas son analizadas por programas bioinformáticos llevando finalmente a la obtención de electroferogramas para su óptima visualización.

7.11 Transfección

El plásmido pGL3-pABER α se transfectó en la línea celular HEK-293T con el método de fosfato de calcio (“*Invitrogen-Calcium Phosphate-Transfection Kit*”, Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. 44-0052). Partiendo de un pre-cultivo confluyente de HEK-293T de 72 h, se sembró una densidad celular de 300×10^3 en una placa de 6 pozos, las células fueron cultivadas en medio DMEM “*Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium*” (MP-Biomedicals, LLC, OH, EUA, No. Cat. 1033120) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Cellgro Corning, Masassas, VA, EUA, No. Cat. 35-010-CV) sin antibiótico durante 18 h, pasado el tiempo de incubación se cambió el medio 4 h antes de iniciar la transfección. Para iniciar la transfección se ocuparon 2 tubos (A y B); el tubo A contenía lo siguiente: ADN (2.5 μg), fosfato de calcio 2 mM y agua cbp 180 μl ; el tubo B contenía 180 μl de amortiguador HBS 2x. Cuando los tubos estaban listos, el tubo B se burbujeó con aire a un ritmo constante, mientras se burbujeaba se le agregó el contenido del tubo A, la mezcla final se incubó durante 20 min a temperatura ambiente, pasado el tiempo de incubación se agitó la mezcla y se tomó el volumen total (360 μl) el cual se vertió por goteo en cada uno de los pozos utilizados para las diferentes condiciones a evaluar, 12 h después de la transfección se realizó cambio de medio DMEM (MP-Biomedicals, LLC, OH, EUA, No. Cat. 1033120) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Cellgro Corning, Masassas, VA, EUA, No. Cat. 35-010-CV), antibiótico-antimicótico (a partir de 100X) penicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (GIBCO[®], Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. 15240), estreptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (GIBCO[®], Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. 15240) y anfotericina-B 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (GIBCO[®], Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. 15290-018). Se vigiló y cuidó su crecimiento durante 48 h a 37 °C con

humedad relativa saturante y 5 % de CO₂, para disponer de ellas en futuros procedimientos experimentales.

Los plásmidos pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD fueron transfectados en la línea celular HEK-293T con liposomas comerciales. Se usaron los reactivos “*Lipofectamine*” en presencia de “*Plus Reagent*” para una mayor eficiencia de transfección (“*LIPOFECTAMINETM-PLUSTM REAGENT*”, *Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA*, No. Cat. 11668027-11514-015). Partiendo de un pre-cultivo confluyente de HEK-293T de 72 h, se sembró una densidad celular de 300 x 10³ en una placa de 6 pozos, las células fueron cultivadas en medio DMEM (MP-Biomedicals, LLC, OH, EUA, No. Cat. 1033120) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Cellgro Corning, Masassas, VA, EUA, No. Cat. 35-010-CV) y sin antibiótico un día antes de la transfección. Pasado el tiempo de incubación se cambió el medio 4 h antes de iniciar la transfección. Para iniciar la transfección se ocuparon 2 tubos (Lípido R y Lípido Lipofectamina); el tubo Lípido R contenía 125 µl de medio DMEM, ADN (2.5 µg), 20 µl de “*Reagent Plus*” (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. 11514-015), la mezcla se llevó a una incubación de 15 min a temperatura ambiente, una vez terminado el tiempo de incubación se preparó el tubo “Lípido Lipofectamina” con 125 µl de medio DMEM, 5 µl de Lipofectamina (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. 11668027), ya obtenida la mezcla se le adicionó la mezcla del tubo Lípido R y se dejó incubando 15 min a temperatura ambiente. Mientras transcurrió el segundo tiempo de incubación se realizaron 2 lavados con medio DMEM sin suero a cada uno de los pozos que contenían las células a transfectar, con la finalidad de disminuir la interferencia por los lípidos del suero. Al finalizar los lavados a la mezcla final de 250 µl (Lípido R + Lípido Lipofectamina) se le adicionaron 750 µl de medio DMEM sin suero para generar una mezcla total de 1 ml que fue agregada a cada pozo. 12 h después de la transfección se realizó cambio de medio DMEM (MP-Biomedicals, LLC, OH, EUA, No. Cat. 1033120) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Cellgro Corning, Masassas, VA, EUA, No. Cat. 35-010-CV), penicilina 100 µg/ml (GIBCO[®], Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. 15240), estreptomycin 100 µg/ml (GIBCO[®], Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. 15240) y anfotericina-B 0.25 µg/ml (GIBCO[®], Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. 15290-018). Se vigiló y cuidó su crecimiento durante 48 h a 37 °C con

humedad relativa saturante y 5 % de CO₂, para disponer de ellas en futuros procedimientos experimentales.

7.12 Microscopía

Las placas de HEK-293T transfectadas con los plásmidos pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD fueron visualizadas por microscopia de fluorescencia (Microscopio Olympus/ IX-71 invertido) con longitud de excitación/emisión de 490nm/530nm en la unidad de microscopia del Instituto de Investigaciones Biomédicas IIB-UNAM con la asistencia técnica del Dr. Miguel Tapia R. El análisis se realizó con la finalidad de observar la expresión de la proteína recombinante fusionada a GFP y así valorar la eficiencia de transfección y la magnitud de expresión en las células transfectadas.

7.13 Citometría de flujo

La células HEK-293T transfectadas con los plásmidos pReceiver, pcDNA3.1 NT-GFP control, pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis GFP-DBD fueron cultivadas en una placa de 6 pozos durante 48 h en medio DMEM (MP-Biomedicals, LLC, OH, EUA, No. Cat. 1033120) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (Cellgro Corning, Masassas, VA, EUA, No. Cat. 35-010-CV), penicilina 100 µg/ml (GIBCO[®], Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. 15240), estreptomycin 100 µg/ml (GIBCO[®], Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. 15240) y anfotericina-B 0.25 µg/ml (GIBCO[®], Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. 15290-018) a 37 °C con humedad relativa saturante y 5 % de CO₂, posterior al tiempo de cultivo se eliminó el medio DMEM mediante succión al vacío, las monocapas celulares adheridas se lavaron dos veces con 1 ml de solución salina (PBS) a temperatura ambiente. Las células fueron despegadas y disgregadas utilizando una incubación de 3 min con 0.5 ml de tripsina al 0.05 % a 37 °C para cada pozo. Las células fueron recolectadas (aproximadamente 0.5 ml) en un tubo que contenía 1 ml de medio de cultivo DMEM para inactivar a la tripsina, los tubos fueron centrifugados inmediatamente para obtener el paquete celular. El paquete celular obtenido se lavó con 1 ml de PBS para eliminar los residuos del medio de cultivo que se utilizó para inactivar a la tripsina, una vez terminado el lavado, el pellet se resuspendió en 0.5 ml de PBS y fue colocado en tubos para espectrofotometría. Las muestras se llevaron al Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo ubicado en el Instituto de Investigaciones

Biomédicas IIB-UNAM para su análisis en el citómetro “*FACScan*” (BECTON DICKINSON) con la asistencia técnica del M. en C. José Luis Ventura Gallegos. Los parámetros analizados fueron: 1) Tamaño “*Forward Scatter*”; 2) Complejidad celular “*Side Scatter*” y 3) Fluorescencia recogida como FL1, para el análisis se cuantificaron 10000 eventos para cada muestra.

7.14 Extracción de RNA

El ARN total fue extraído de las células HEK-293T transfectadas con los plásmidos pGL3-pABER α , pcDNA3.1 NT-GFP control, pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis GFP-DBD utilizando el reactivo “*TriPure Isolation Reagent*” (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania, No. Cat. 11667157001) siguiendo las instrucciones del proveedor. El procedimiento fue el siguiente: Se adicionó 1 ml de “*TriPure Isolation Reagent*” a las cajas Petri por cada condición experimental, se raspó toda la superficie de la caja donde se encontraban adheridas las células con una espátula nueva y estéril, todo el material generado se recuperó en un tubo nuevo y estéril; Se resuspendió el volumen obtenido con una jeringa de 3 ml; Se incubó 5 min a temperatura ambiente; Se adicionó 0.2 ml de cloroformo al 100 %, se agitó vigorosamente durante 15 seg y se incubó 15 min a temperatura ambiente, posteriormente, se centrifugó 15 min a 12000 g a 8 °C; Se recuperó la fase acuosa y se mezcló con 0.5 ml de isopropanol al 100 %, se agitaron los tubos e incubaron 5 min a temperatura ambiente; Se centrifugaron los tubos 10 min a 12000 g a 8 °C, se eliminó el sobrenadante de cada tubo y el pellet obtenido se lavó con 1 ml de etanol al 75 % y se centrifugaron 5 min a 7500 g a 8 °C; Se eliminó el etanol por medio de aspiración al vacío y el pellet blanco obtenido se secó a temperatura ambiente hasta observarlo transparente; Se resuspendió cada pellet en agua estéril y se incubaron a 55 °C por 15 min. Se verificó la ausencia de proteínas contaminantes así como la concentración y rendimiento con una lectura espectrofotométrica a 260 nm y 280 nm UV (DU-62 - Beckman Coulter, No. Cat. 793218978). La integridad del ARN total y la ausencia de ADN genómico contaminante fue evaluada mediante la separación electroforética del ARN ribosomal en gel de agarosa desnaturalizante al 1 % en presencia de formaldehído al 5 %. Se tomó 1 μ g de ARN total obtenido que fue tratado con una mezcla de formaldehído, formamida, amortiguador de carga, bromuro de etidio (0.5 μ g/ μ l) y MOPS 10X, ajustada a

un volumen final de aproximadamente 10 μ l, el volumen final de la mezcla fue incubada a 55 °C por 15 min para asegurar la desnaturalización de las estructuras secundarias del ARN. El amortiguador de corrida utilizado para la separación electroforética fue MOPS 1X.

7.15 RT- PCR

Para obtener el ADNc de las células transfectadas, se realizó una reacción de amplificación con la enzima transcriptasa reversa utilizando el kit “*M-MLV Reverse Transcriptase*” (Promega Corporation, Madison, WI, EUA, No. Cat. M1701), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó una concentración de 2 μ g/ μ l de ARN total que fue mezclado con 1 μ g de Oligo-dT (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. N8080128) y se colocó en el termociclador a 70 °C por 5 min, se incubó a 4° C inmediatamente terminado el ciclo. Posteriormente, a la mezcla anterior se le agregaron 5 μ l de amortiguador M-MLV 5X (Promega Corporation, Madison, WI, EUA, No. Cat. M1701), 1 μ l de la mezcla de dNTPs 25 mM (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. R1121), 1.25 μ l de inhibidor de ribonucleasa (Roche, MO, EUA, No. Cat. S02302), 1 μ l de la enzima M-MLV RT (Promega Corporation, Madison, WI, EUA, No. Cat. M1701), la mezcla generada se colocó en el termociclador a 42 °C por 45 min. Se realizó PCR de cada uno de los ADNc obtenidos, manejando las condiciones de amplificación mencionadas anteriormente.

7.16 *Western-blot*

Las células HEK-293T transfectadas con los plásmidos pGL3-pABER α , pcDNA3.1 NT-GFP control, pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis GFP-DBD fueron cultivadas durante 48 h, posterior al tiempo de cultivo las monocapas celulares se lavaron dos veces con 1 ml de solución salina (PBS) a temperatura ambiente. Después de remover el segundo lavado se adicionaron 200 μ l de la solución de lisis (PBS pH7.4, 1 % de NP40, 0.5 % deoxicolato de sodio, 0.1 % SDS adicionado con 1 mM de PMSF, 1 mM de ortovanadato de sodio, 1 mM de NaF y 1X de complete), mojando toda la superficie. La mezcla de células y solución de lisis se raspó con una espátula de plástico estéril a 4 °C. Se recuperó toda la suspensión con el lisado celular y se centrifugó a 14000 rpm por 10 min a 8 °C. Se colectó el sobrenadante y cuantificó la cantidad de proteína obtenida de cada extracto

citoplasmático mediante el método de Bradford (BIO-RAD, Hércules, CA, EUA). Se ocuparon diferentes concentraciones de proteína (2.5, 5 y 10 μg) de cada extracto citoplasmático que fueron mezclados con el amortiguador LaemmLi 5X. Después de incubar en ebullición durante 5 min se pasaron inmediatamente a una temperatura de 4 °C para su estabilización. Se realizó una electroforesis de las muestras en un gel de poliacrilamida discontinuo (concentrador 4 %; separador 7.5 % o 10 %). La corrida electroforética se efectuó a 99 volts durante 1.5 h hasta obtener la separación proteica deseada, tomando como referencia el patrón de bandeado del marcador de peso molecular “*Precision Plus ProteinTM Standards (Dual Color)*” (BIO-RAD, Hercules, CA, EUA, No. Cat. 161-0374). Mediante una electrotransferencia húmeda, las proteínas separadas fueron transferidas a una membrana de PVDF (0.451 μm , Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) a un voltaje aproximado de 50 volts. Las membranas resultantes fueron bloqueadas con una solución TBS-TWEEN[®]20 al 0.1 % (SIGMA-ALDRICHTM, INC, MO, EUA, No. Cat. 087K01971) mezclado con leche descremada al 5% (Svelty, Nestlé de México S.A de C. V.). Después, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios diluidos en TBS-TWEEN[®]20 al 0.1 % (SIGMA-ALDRICHTM, INC, MO, EUA, No. Cat. 087K01971) mezclado con albúmina (“*Bovine Albumin Fraction V*”, MP-Biomedicals, LLC, OH, EUA, No. Cat. 810033) al 1 %, los anticuerpos utilizados fueron: Anti-DBD Gal4 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA, policlonal, Sc-577) diluido 1:2000, Anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA, monoclonal, Sc-9996) diluido 1:1000, Anti- β Actina (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA, monoclonal, Sc-4778) diluido 1:1000, Anti- α Tubulina (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA, monoclonal, Sc-32293) diluido 1:2000. Consecutivamente las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios Anti-conejo y Anti-ratón, respectivamente diluidos en TBS-TWEEN[®]20 al 0.1 % (SIGMA-ALDRICHTM, INC, MO, EUA, No. Cat. 087K01971) adicionado con leche descremada al 5%. La presencia de las proteínas de interés fue revelada mediante quimioluminiscencia con el reactivo SuperSignal[®] West Pico (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. 34087) a través de una película fotográfica (Kodak, Rochester NY, EUA) sometida a diferentes tiempos de exposición.

8. RESULTADOS

8.1 Amplificación de los promotores A y B del receptor a estrógenos alfa (ER α)

Para la amplificación de los promotores A y B del ER α , se realizó la extracción de ADN genómico de un cultivo de la línea celular de cáncer de mama MCF-7, positiva a ER α . Una vez obtenido el ADN, se estandarizaron las condiciones óptimas para el proceso de amplificación de los promotores mediante PCR. Para este procedimiento se ocuparon el par de iniciadores 1-21HpaI y 1-22XhoI para el promotor A, en lo que respecta al promotor B se utilizaron 1-31HpaI y 1-32XhoI, dichos iniciadores tienen una T_m de 58°C como temperatura óptima para la amplificación. La amplificación conjunta de los promotores A y B, se realizó con la mezcla de los iniciadores mencionados anteriormente (1-21 *Hpa* I y 1-32 *Xho* I). En la figura 13 se muestra un gel de agarosa donde se observa un fragmento de 300 pb correspondiente al amplicon esperado del promotor A del ER α , el de 350 pb del promotor B y finalmente el fragmento de 650pb correspondiente a la amplificación de ambos promotores (AB).

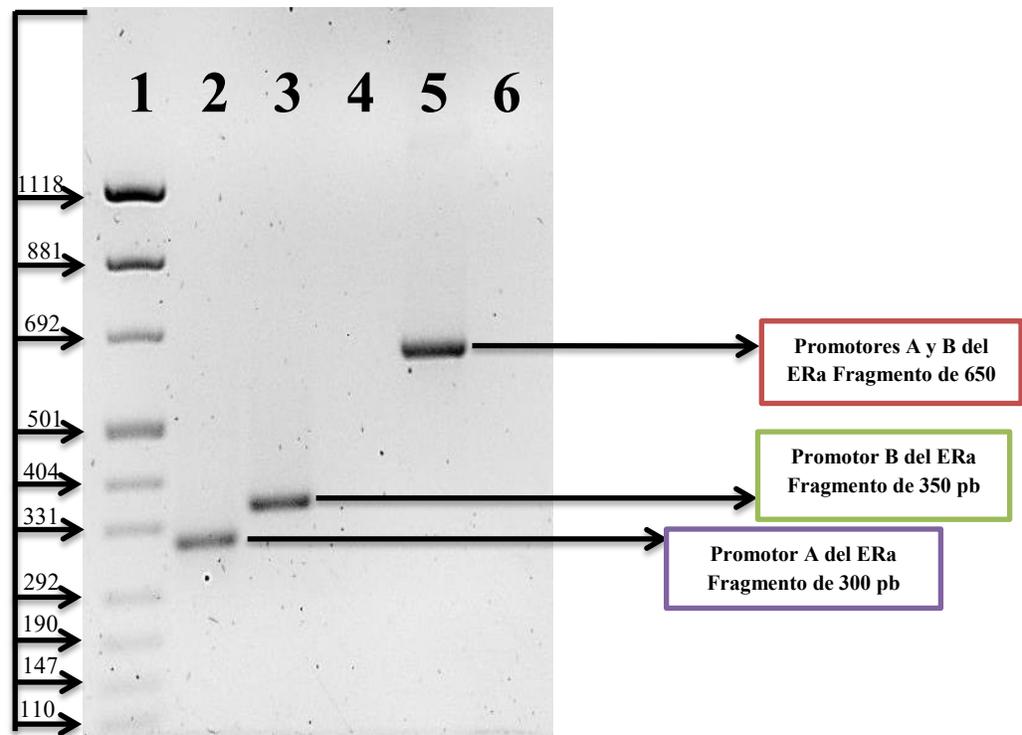
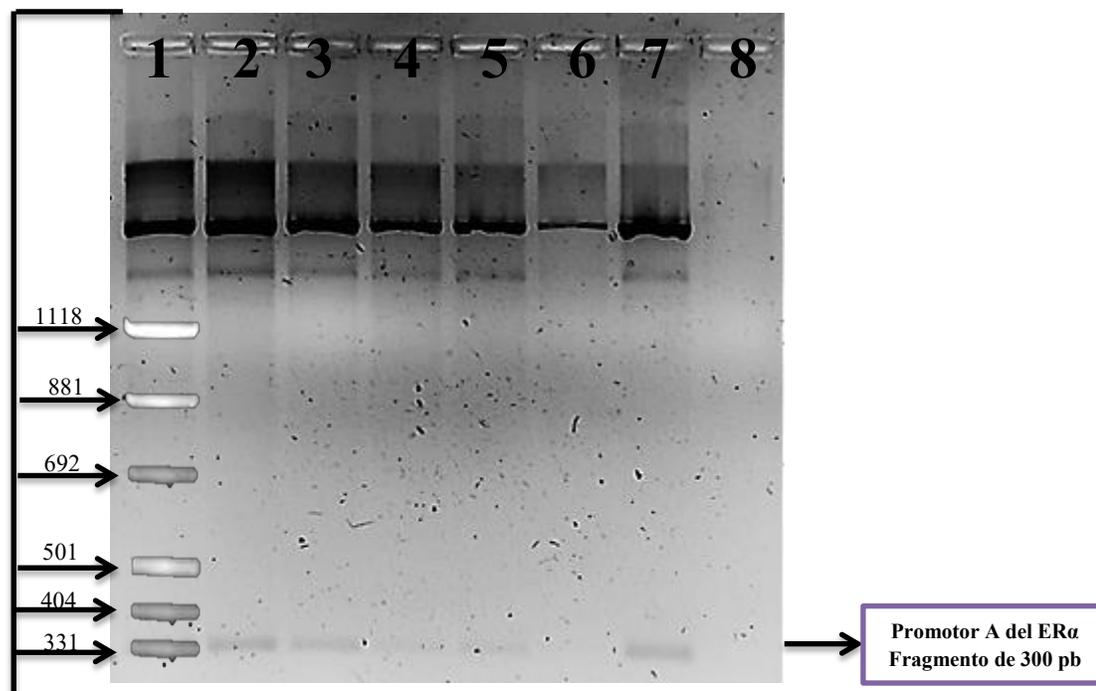


Fig.13. PCR de los promotores A y B del ER α . Gel de agarosa teñido con BrEt con los productos de amplificación de los promotores A y B del ER α con los pares de iniciadores 1-21HpaI-1-22XhoI y 1-31HpaI-1-32XhoI. 1) Marcador de peso molecular, 2) PCR a 58°C del promotor A del ER α , 3) PCR a 58°C del

promotor B del ER α , 4) Vacío, 5) PCR a 58°C de ambos promotores (AB) del ER α . Se obtuvo la amplificación de los promotores A, B y la amplificación conjunta de ambos promotores AB del ER α .

8.2 Clonación del promotor A en el vector pCR2.1 TOPO

Una vez obtenido el amplicon de 300 pb del promotor A del ER α , se realizó la clonación del mismo en el vector pCR2.1 TOPO para posteriormente llevar a cabo la transformación de células de *E. coli* DH5 α . Se seleccionaron aquellas colonias que crecieron en placas adicionadas con ampicilina y con fenotipo blanco. Una vez seleccionadas, las clonas se crecieron en medio líquido LB durante 16 h a 37 °C; a continuación se obtuvo el paquete celular, al cual se le realizó extracción de ADN plasmídico. El ADN obtenido se analizó mediante restricción con la enzima *Eco* RI, con la finalidad de comprobar si la clonación fue exitosa. Como se observa en la Fig. 14, se obtuvo el ADN de 7 clonas distintas denominadas como 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14, las cuales mostraron que contenían el plásmido generado por ligación “pCR2.1-pAER α ”. Al cortar a pCR2.1-pAER α con *Eco* RI se generan 2 fragmentos de tamaños diferentes: 1) 3.9 Kb correspondiente al vector pCR2.1 linealizado y 2) 300 pb correspondiente al inserto (pAER α).



promotor A del ER α . 1) Marcador de peso molecular, 2) Clona 8, 3) Clona 9, 4) Clonas 10, 5) Clona 11, 6) Clona 12, 7) Clona 13 y 8) Clona 14.

8.3 Direccionalidad del inserto en pCR2.1 TOPO

Para corroborar la direccionalidad del inserto pAER α (5'→3' o 3'→5') en el vector de clonación, se realizó una restricción con la enzima *Xho* I debido a que el vector pCR2.1 TOPO así como el extremo 3' del amplicon del pAER α contienen un sitio de corte para esta enzima, como se muestra en la Fig. 15, donde se esquematiza el mapa físico del vector de clonación pCR2.1 TOPO. Si la inserción del pAER α en el vector se encontraba en la dirección 5'→3' se generaría un fragmento de 4.2 Kb y uno de 40 pb (el cual no se podría observar en el gel debido a su tamaño), de lo contrario se vería la liberación del fragmento de 300 pb correspondientes al pAER α como se muestra en la Fig. 16, en donde también se puede observar que el plásmido pCR2.1-pAER α de las clonas 8, 9, 10, 11 y 12 contienen el inserto en la dirección 5'→3' ya que se obtiene un fragmento de 4.2 Kb, mientras que el plásmido pCR2.1-pAER α de las clonas 13 y 14 tienen el inserto en la dirección 3'→5' mostrando la liberación del inserto de pAER α con un peso de 300 pb.

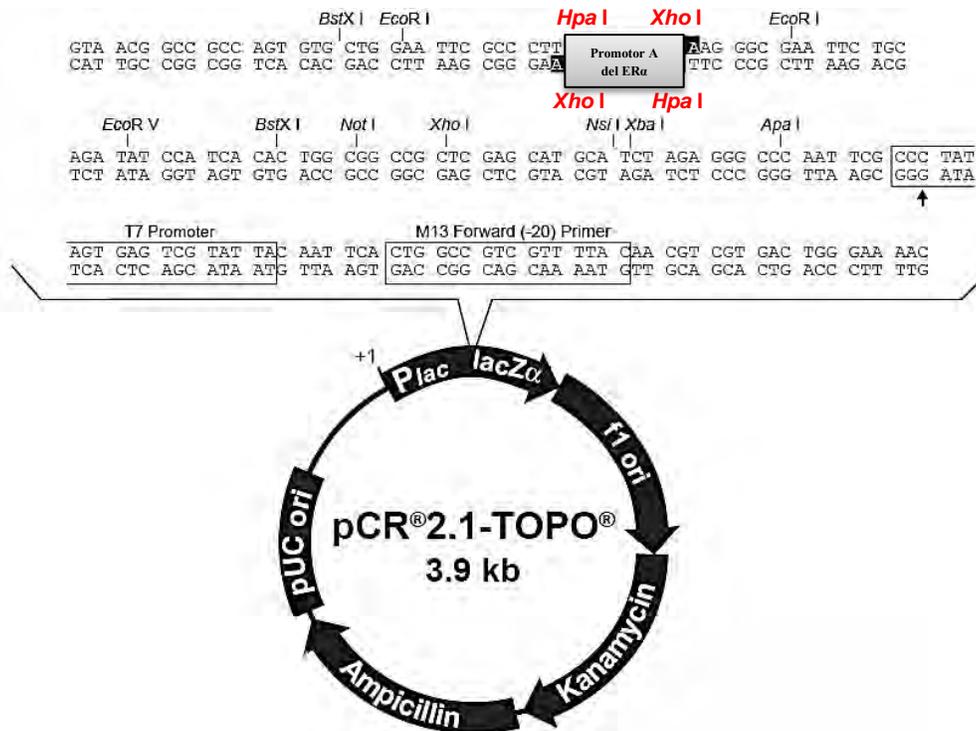


Fig. 15. Mapa físico del vector de clonación pCR2.1 TOPO con su sitio de multiclonación.

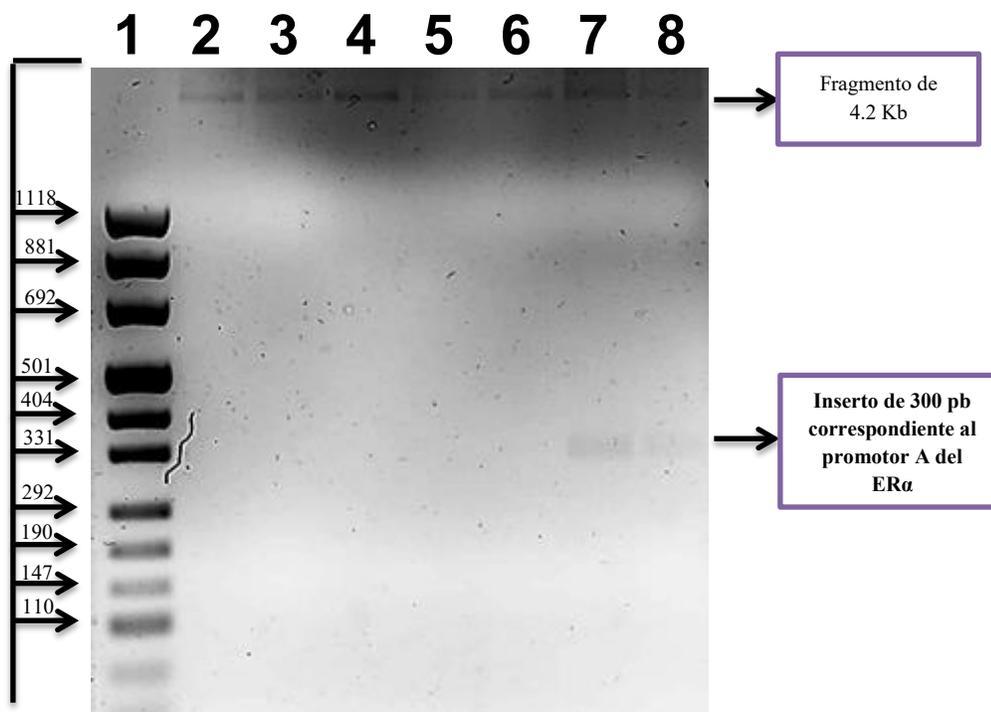


Fig. 16. Restricción con *Xho* I del ADN de las clonas seleccionadas durante la clonación del pAER α . Gel de agarosa teñido con BrEt con los productos de la restricción con *Xho* I a los plásmidos de las 7 clonas seleccionadas, para comprobar la dirección del inserto en el vector de clonación 1) Marcador de peso molecular, 2) Clona 8, 3) Clona 9, 4) Clonas 10, 5) Clona 11, 6) Clona 12, 7) Clona 13 y 8) Clona 14.

8.4 Comprobación de la obtención de pCR2.1-pAER α por PCR

Las clonas que contenían el plásmido pCR2.1-pAER α con el inserto en la dirección 5'→3' fueron sometidas a un análisis de PCR para corroborar que el inserto que se clonó en el vector pCR2.1 TOPO correspondiera a la secuencia del pAER α . Para el PCR se utilizaron los mismos iniciadores que se ocuparon para la amplificación original del promotor A antes mencionada y mostrada. Como se observa en la Fig. 17, el ADN correspondiente a las clonas seleccionadas resultaron positivos al PCR amplificando un fragmento con un tamaño de 300 pb correspondiente al tamaño del promotor A. De igual modo se ocupó un control negativo para asegurar que el procedimiento experimental se realizó de manera adecuada y de esta forma descartar los falsos positivos por contaminación de los elementos de la mezcla de reacción.

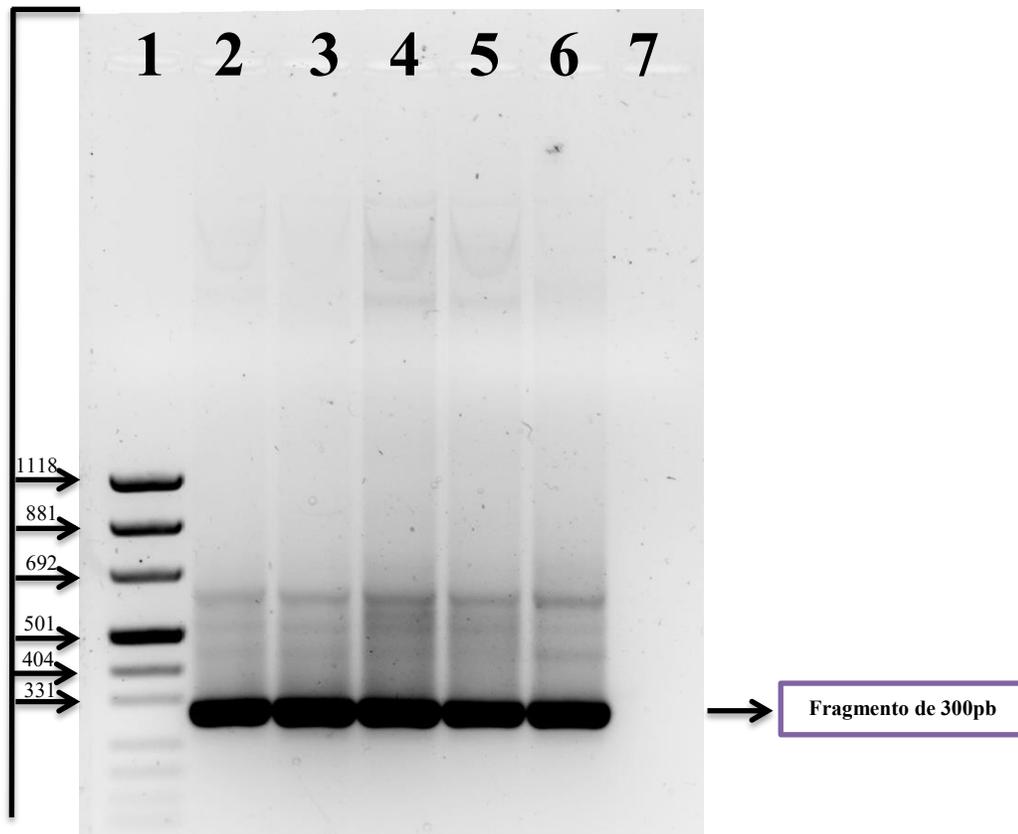


Fig. 17. PCR del ADN de las clonas con pAER α en dirección 5'→3'. Gel de agarosa teñido con BrEt con los productos de PCR, para corroborar que el inserto correspondiera a la secuencia del promotor A del ER α 1) Marcador de peso molecular, 2) Clona 8, 3) Clona 9, 4) Clonas 10, 5) Clona 11, 6) Clona 12, 7) control negativo (contiene todo los elementos para una PCR excepto el ADN templado).

8.5 Clonación de pABER α en el vector pCR2.1 TOPO

Posterior a la obtención del amplicon de 650 pb, correspondiente a las secuencias de pABER α , como se muestra en la Fig. 13, se clonó en el vector pCR2.1 TOPO, para llevar a cabo la transformación constitutiva de células químicamente competentes de *E. coli* DH5 α . Una vez realizada la transformación, se seleccionaron aquellas colonias blancas que crecieron en las placas de LB con ampicilina. Algunas de las colonias fueron seleccionadas para su crecimiento en medio líquido LB durante 16 h a 37°C. De los cultivos de las clonas se obtuvieron los paquetes celulares, a los cuales se les realizó extracción de ADN plasmídico como se describe en materiales y métodos. Una vez obtenido el ADN plasmídico, se comprobó la clonación por análisis de restricción con la enzima *Eco* RI; los perfiles de restricción generados se muestran en la Fig. 18, donde se observa que todas las clonas seleccionadas contienen el plásmido “pCR2.1-pABER α ”. Se analizó el ADN

plasmídico de 7 clonas, denominadas como 2, 3, 7, 8, 9, 10 y 11, los cuales mostraban los fragmentos esperados con los cortes realizados con *Eco* RI, en los que se puede observar la liberación del vector de clonación pCR2.1 TOPO con un peso de 3.9 Kb y el inserto pABER α con un peso aproximado de 670 pb, con lo que se comprobó que todas presentaban la construcción deseada (pCR2.1-pABER α).

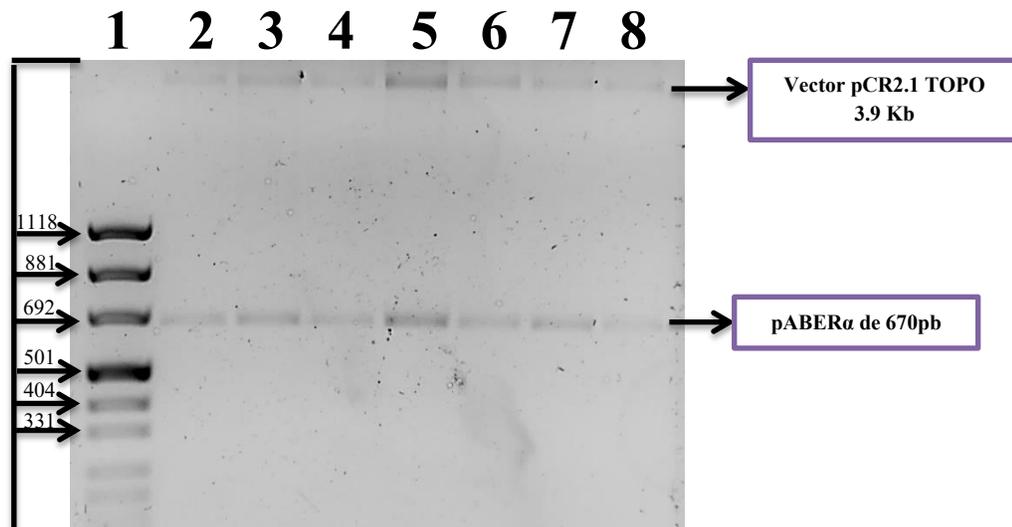


Fig. 18. Restricción con *Eco* RI de las clonas seleccionadas durante la clonación de pABER α . Gel de agarosa teñido con BrEt con los productos de la restricción con *Eco* RI al ADN plasmídico de las 7 clonas seleccionadas, para comprobar si tenían el producto de la clonación entre el vector pCR2.1 TOPO y amplicon de los promotores Ay B del ER α . 1) Marcador de peso molecular, 2) Clona 2, 3) Clona 3, 4) Clonas 7, 5) Clona 8, 6) Clona 9, 7) Clona 10 y 8) Clona 11.

Una vez que se comprobó que las clonas seleccionadas tenían la construcción deseada (pCR2.1-pABER α), se corroboró la dirección en que el inserto se clonó en el vector pCR2.1 TOPO mediante ensayos de restricción con la enzima *Xho* I. El perfil de restricción obtenido fue el esperado, ya que si el inserto se encontraba en la dirección 5'→3' sólo se obtendría al plásmido linealizado con un peso de 4550 pb, de lo contrario el inserto sería liberado obteniéndose un patrón de restricción con 2 bandas: una con un tamaño aproximado de 670 pb (pABER α) y una de 3.9 Kb correspondiente al vector de clonación pCR2.1 TOPO como se muestra en la Fig. 19, en donde se observa que la inserción de pABER α en el vector pCR2.1 TOPO de las clonas 3, 7, 8, 9, 10 y 11 fue en la dirección 5'→3', ya que solo se linealiza el plásmido pCR2.1-pABER α , mientras que la inserción de

pABER α en el vector pCR2.1 TOPO en la clona 2 fue en dirección 3'→5' mostrando la liberación de pABER α con un peso aproximado de 670 pb.

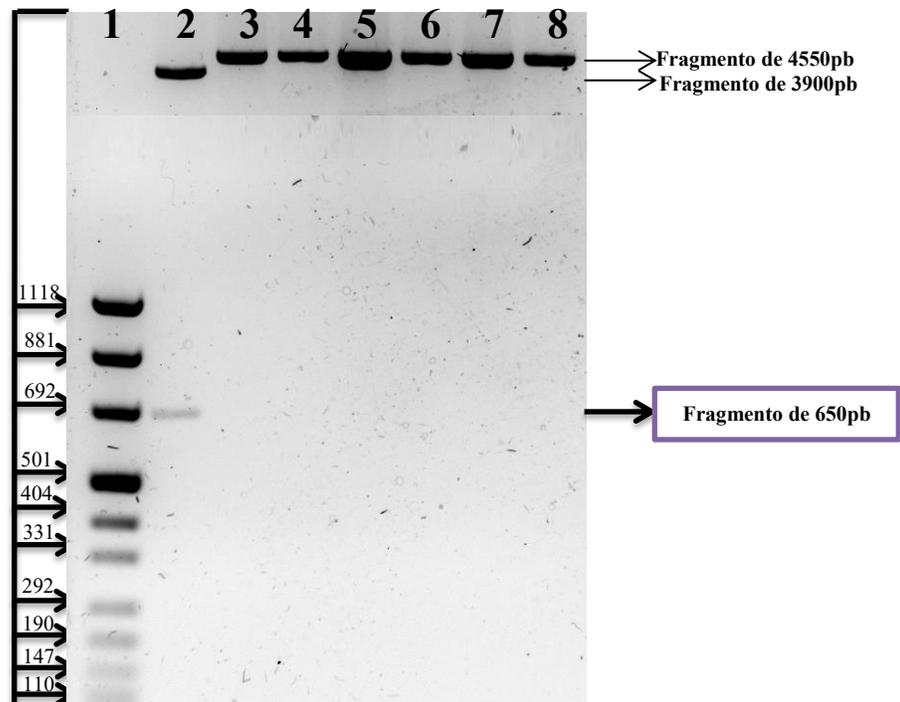


Fig. 19. Restricción con *Xho*I de las clonas seleccionadas con pCR2.1-pABER α . Gel de agarosa teñido con BrEt que muestra el resultado de la restricción con *Xho* I al ADN plasmídico a las 7 clonas seleccionadas, para comprobar la dirección del inserto en el vector de clonación: 1) Marcador de peso molecular, 2) Clona 2, 3) Clona 3, 4) Clonas 7, 5) Clona 8, 6) Clona 9, 7) Clona 10 y 8) Clona 11.

A todas las clonas seleccionadas se les realizó PCR para corroborar que el inserto que se clonó en el vector pCR2.1 TOPO correspondiera a la secuencia de pABER α . Para el PCR se utilizó como iniciador sentido a 1-31HpaI de pBER α y 1-22XhoI de pAER α como iniciador antisentido, los cuales se ocuparon para la amplificación original de los promotores A y B antes mencionada y mostrada. Los resultados obtenidos de la amplificación se muestran en la Fig. 20, donde se observa que las clonas seleccionadas contienen al plásmido pCR2.1-pABER α , ya que fueron positivas a la amplificación del fragmento esperado de 650 pb, correspondiente a pABER α .

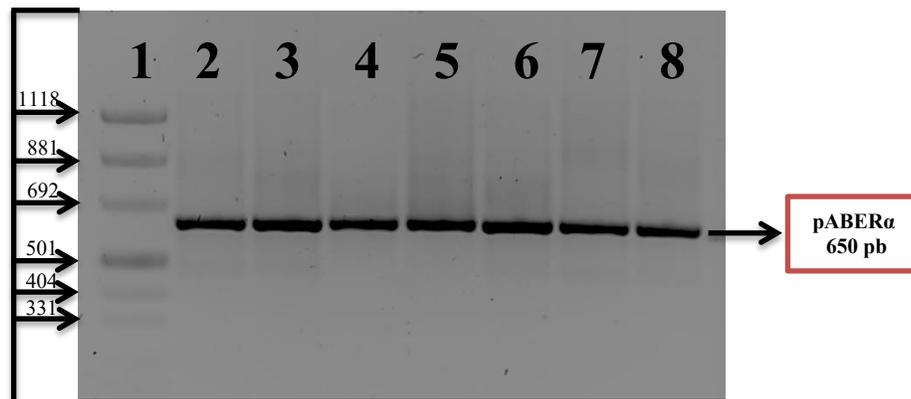


Fig. 20. PCR de las clonas seleccionadas con el plásmido pCR2.1-pABER α . Gel de agarosa teñido con BrEt que muestra el resultado de las PCRs de las clonas seleccionadas para corroborar que el inserto correspondiera a la secuencia de los promotores A y B del ER α 1) Marcador de peso molecular, 2) Clona 2, 3) Clona 3, 4) Clona 7, 5) Clona 8, 6) Clona 9, 7) Clona 10, 8) Clona 11.

8.6 Subclonación de pABER α en pGL3Basic

Una vez obtenidas y corroboradas las clonas que contienen el plásmido pCR2.1-pABER α , se decidió trabajar con la clona 9, la cual se analizó con programas bioinformáticos para generar un mapa genético como se muestra en la Fig. 21. De esta forma se encontró una enzima de restricción que tuviera un sitio de corte único en la región 5' del sitio de inserción de pABER α en pCR2.1 TOPO. Esto permitió subclonar a los pABER α en el vector pGL3Basic, que contiene el ADNc del gen reportero de luciferasa, como se muestra en la Fig. 22. El análisis *in silico* mostró que la enzima de restricción *Kpn* I era idónea para este procedimiento, ya que reconoce un sitio ubicado a 55 pb del sitio de inserción de los pABER α en el vector pCR2.1 TOPO. Además de *Kpn* I se eligió cortar con la enzima *Xho* I para liberar un inserto de 670 pb (perteneciente a la secuencia de pABER α) del vector pCR2.1 TOPO. El corte generado con ambas enzimas evitaría la inserción de pABER α en pGL3Basic con dirección 3'→5'.

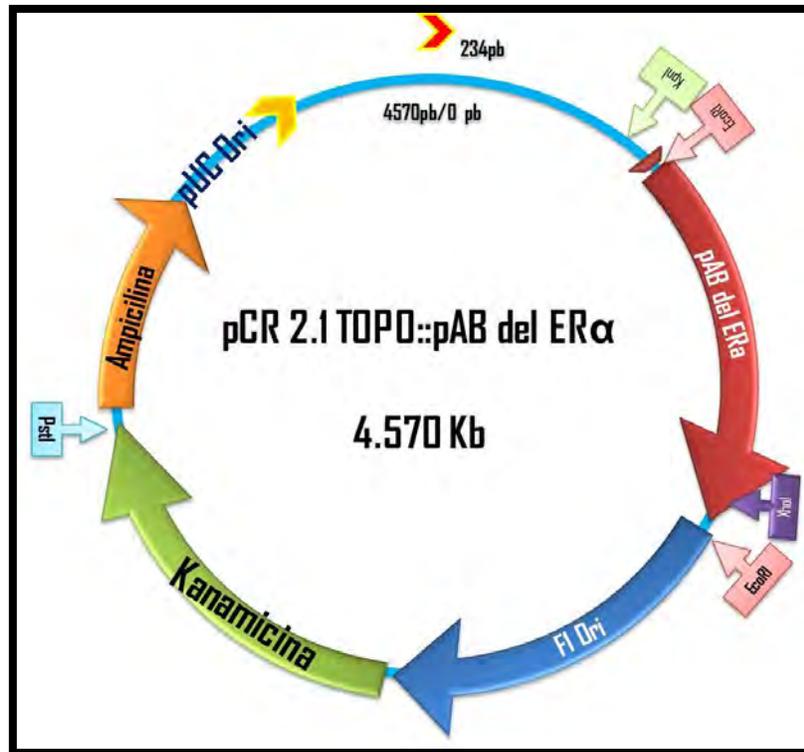


Fig. 21. Mapa genético del plásmido pCR2.1-pABER α . Se representa el contexto genético del inserto pABER α en la dirección 5'→3' así como los sitios de corte para las enzimas de restricción *Eco* RI, *Kpn* I, *Xho* I y *Pst* I. Es importante resaltar la direccionalidad del inserto para futuras referencias en procesos de subclonación.

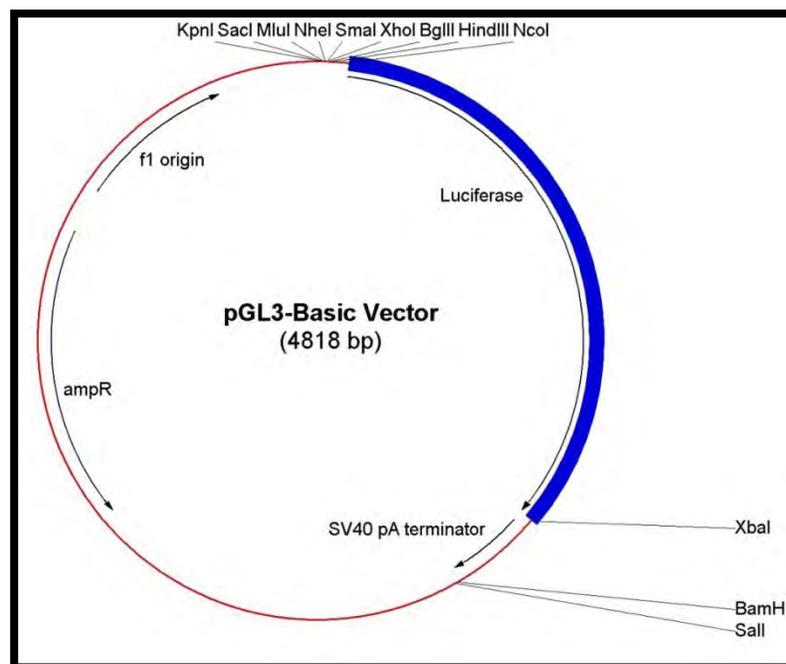


Fig. 22. Mapa genético del vector pGL3Basic. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción del sitio de multiclonación. .

Para realizar la subclonación en el vector pGL3Basic, tanto pGL3Basic como la clona 9 se sometieron a ensayos de restricción sincrónicos con las enzimas de restricción seleccionadas (*Kpn* I y *Xho* I). La clona 9 digerida con ambas enzimas dio como resultado la obtención de bandas con tamaños diferentes, una con un tamaño de 3.9 Kb que pertenece al vector de clonación pCR2.1 TOPO y una pequeña de 670 pb correspondiente al inserto de pABER α . Por otro lado, la restricción del vector pGL3Basic con ambas enzimas genera un fragmento de 27 pb (ubicadas entre los sitios de corte de *Kpn* I y *Xho* I) que no se visualiza en el gel, observándose únicamente un fragmento de 4.8 Kb con un tamaño de escasa diferencia con el vector linealizado (Fig. 23).

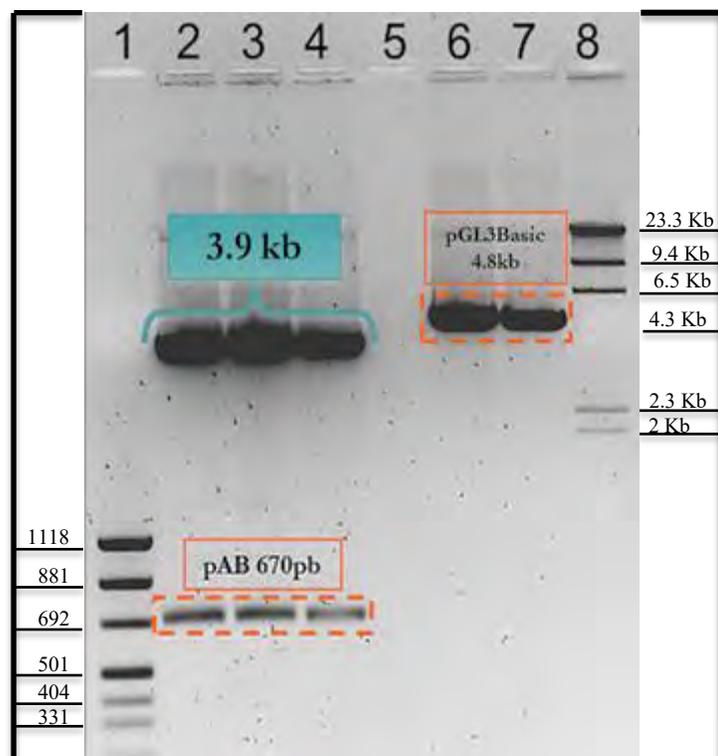


Fig. 23. Restricción de la clona 9 y del vector pGL3Basic con las enzimas *Kpn* I y *Xho* I. Gel de agarosa teñido con BrEt que muestra la liberación de pABER α del plásmido pCR2.1-pABER α y digestión del vector pGL3Basic con las enzimas de restricción *Kpn* I y *Xho* I y. 1) Marcador de peso molecular, 2), 3) y 4) Restricción de la clona 9, 5) vacío, 6), 7) Restricción del vector pGL3Basic y 8) Marcador de peso molecular lamda *Hind* III.

Una fracción de la reacción de restricción fue sometida a ligación empleando el sistema “ShotGun” para ligar el inserto de 670 pb correspondiente a pABER α al vector pGL3Basic.

8.7 Comprobación de la obtención del plásmido pGL3-pABER α

El producto de la reacción de ligación con el sistema “*ShotGun*” fue transformado en *E. coli* DH5 α , las clonas obtenidas se sometieron a ensayos de PCR para comprobar si la subclonación había ocurrido correctamente, puesto que la desventaja de utilizar la técnica de “*ShotGun*” es la ligación inespecífica de todas las moléculas de ADN que se encuentran dentro de reacción, pudiendo generar productos no deseados (vector/vector; re-ligación; vector/inserto/vector; entre otras posibilidades). Para la PCR se utilizó el iniciador 1-31HpaI de pBER α (como iniciador sentido) y 1-22XhoI de pAER α (como iniciador antisentido), los cuales se ocuparon para la amplificación original de los promotores A y B del ER α . Se observa que el ADN plasmídico obtenido de las clonas fue positivo al ensayo de PCR, amplificando un fragmento con un peso de 650 pb correspondiente al tamaño de pABER α , sugiriendo que estas clonas contienen efectivamente el plásmido “pGL3-pABER α ” (Fig. 24).

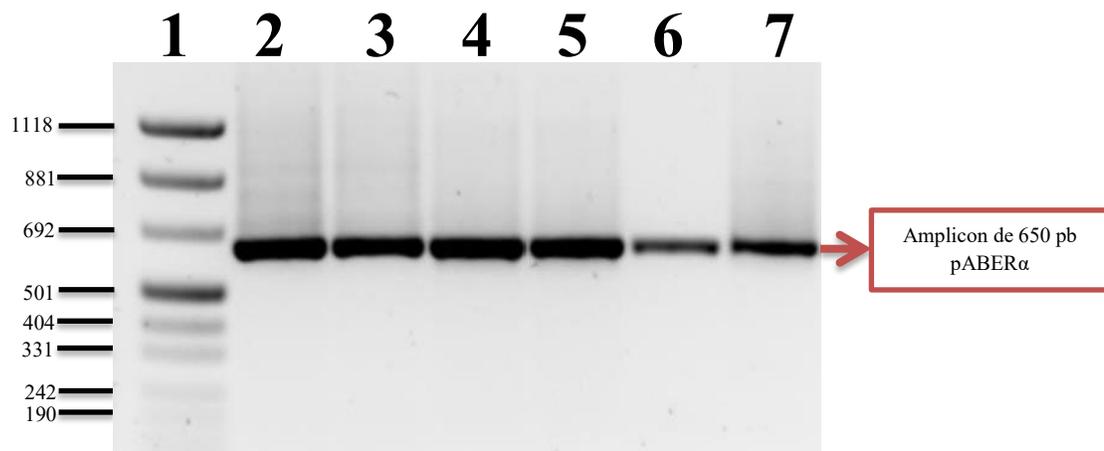


Fig. 24. PCR de las clonas resultantes de la ligación con el sistema “*ShotGun*”. Gel de agarosa teñido con BrEt que muestra el resultado después de realizar una PCR de los plásmidos recuperados de las clonas seleccionadas para comprobar que el inserto correspondiera a la secuencia de pABER α 1) Marcador de peso molecular, 2) Clona 1, 3) Clona 2, 4) Clonas 3, 5) Clona 4, 6) Clona 5, 7) Control positivo (clona 9).

Para corroborar la obtención del plásmido pGL3-pABER α , las clonas positivas al PCR se sometieron a ensayos de restricción con las enzimas *Kpn* I y *Xho* I, mismas que se eligieron para subclonar, la ligación por el sistema de “*ShotGun*” generó al plásmido deseado. Como se observó con la clona 1, la restricción con las enzimas produciría la liberación del inserto

(pABER α) con un tamaño de 670 pb así como una banda de 4.8 Kb perteneciente al peso del vector pGL3Basic; si, por el contrario, la clonación por este sistema no fue exitosa, obteniéndose ligaciones aberrantes, se vería un patrón de bandeo diferente al esperado. Como se observa en la Fig. 25, únicamente la clona 1 contiene al plásmido deseado (pGL3-pABER α).

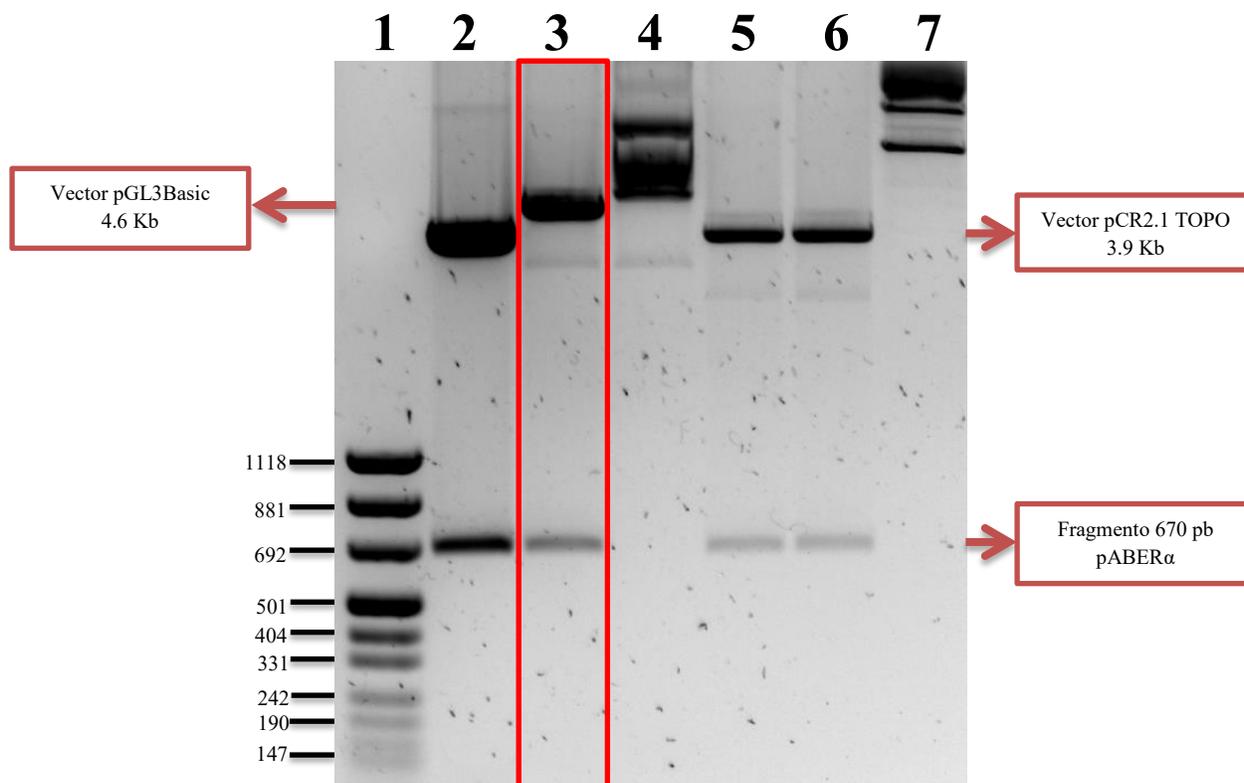


Fig. 25. Restricción con *Kpn* I y *Xho* I del ADN plasmídico de las clonas resultantes del “ShotGun”. Gel de agarosa teñido con BrEt que muestra el resultado de la restricción con las enzimas *Kpn* I y *Xho* I para corroborar la obtención de la subclonación en el vector pGL3 1) Marcador de peso molecular, 2) Control positivo (clona 9), 3) Clona 1, 4) Clonas 2, 5) Clona 3, 6) Clona 4, 7) Clona 5.

8.8 Ensayo comparativo entre la clonación de pAB del ER α en pCR2.1 TOPO y pGL3.

Una vez que se comprobó que la clona 1 contenía al plásmido pGL3-pABER α , se realizó un análisis comparativo entre la clona 9 (pCR2.1-pABER α) y la clona 1 (pGL3-pABER α). Esto se realizó con el fin de ilustrar la diferencia de tamaño entre ambas construcciones (Fig. 26). Para dicho ensayo se utilizaron las enzimas de restricción *Kpn* I y *Xho* I para

liberar al inserto de 670 pb (pABER α) de los vectores, así como la enzima *Hind* III para linealizar a los plásmidos generados (pCR2.1-pABER α y pGL3-pABER α).

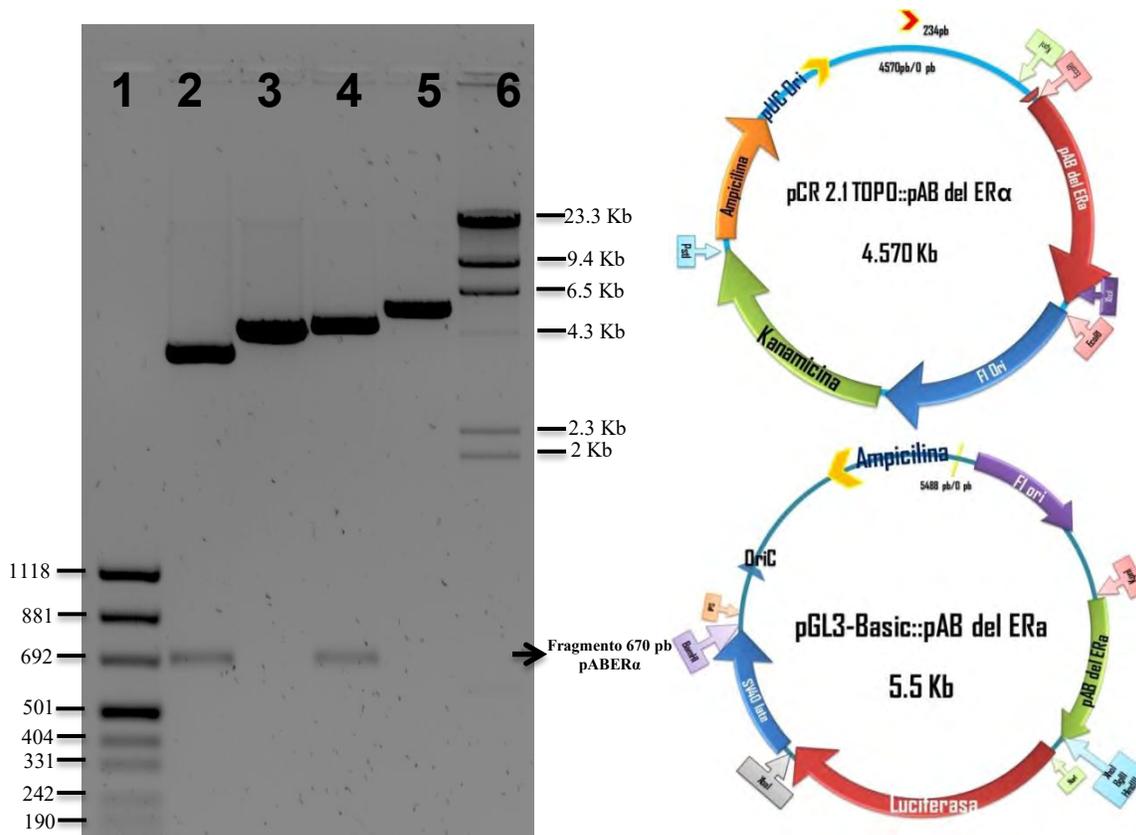


Fig. 26. Restricción de las clonas 9 y 1 con *Kpn*I-*Xho*I y *Hind*III. Mapas genéticos. Gel de agarosa teñido con BrEt que muestra el resultado de un ensayo de restricción con las enzimas *Kpn* I y *Xho* I para el análisis comparativo de la ligación de la secuencia de pABER α en los diferentes vectores. 1) Marcador de peso molecular, 2) Clona 9 *Kpn* I-*Xho* I, 3) Clona 9 *Hind* III, 4) Clona 1 *Kpn* I-*Xho* I, 5) Clona 1 *Hind* III y 6) Marcador de peso molecular lamda *Hind* III.

8.9 Amplificación por PCR de DBD_{Gal4}

Para la amplificación de DBD_{Gal4}, se realizó la extracción de ADN plasmídico de un cultivo de *E. coli* DH5 α que contiene el vector pGBKT7. Una vez obtenido el ADN, se prosiguió a estandarizar las condiciones óptimas para el proceso de amplificación mediante la técnica de PCR. Para este procedimiento se ocupó el par de iniciadores fDBDKpnI y rDBDEcoRV, que tienen una T_m de 60 °C como temperatura óptima para la amplificación, obteniéndose un producto de 555 pb como se observa en la Fig. 27.

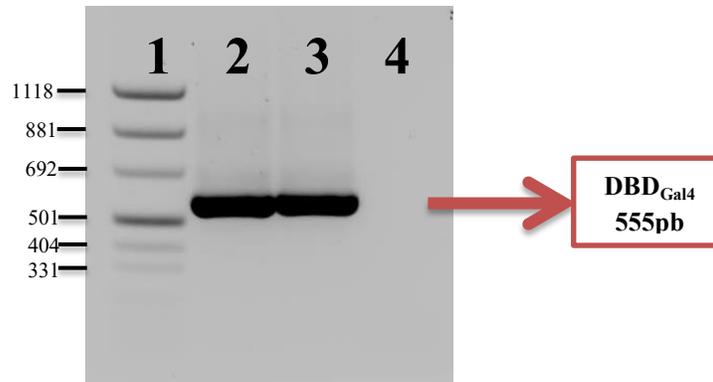


Fig.27. Amplificación de DBD_{Gal4} a partir del plásmido pGBKT7. Gel de agarosa teñido con BrEt que muestra la amplificación DBD_{Gal4} con el par de iniciadores fDBDKpnI y rDBDEcoRV. 1) Marcador de peso molecular, 2) PCR a 58°C del DBD de Gal4, 3) PCR a 60°C del DBD de Gal4, 4) Vacío.

8.10 Clonación del DBD_{Gal4} en el vector de expresión pcDNA3.1 NT-GFP TOPO

Para obtener la clonación de DBD_{Gal4} en el vector de expresión pcDNA3.1 NT-GFP TOPO, el plásmido pGBKT7 y el amplicón de 555 pb de DBD_{Gal4}, se deshidrataron al vacío durante 2 h en el equipo de secado SAVANT (“*Speed Vac[®] Plus*”, No. Cat. SC210A) a 1000 rpm. Ambos plásmidos deshidratados se enviaron a una empresa especializada en procedimientos moleculares “*Science Exchange-ProNovus Bioscienc, LLC*” (Mountain, CA, EUA) que cuentan con el sistema de clonación basado en el vector de expresión pcDNA3.1 NT-GFP TOPO. Una vez obtenida la clonación, la empresa nos envió los plásmidos generados (pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD) embebidos en papel filtro, los cuales se reconstituyeron en agua estéril. Las soluciones con cada plásmido se cuantificaron para conocer su concentración. Para corroborar la identidad de los plásmidos pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD se realizaron ensayos de restricción con la enzima *Hind* III, la cual lineraliza a ambos plásmidos con un peso aproximado de 6.7 Kb, como se muestra en la Fig. 28. Una vez confirmada la identidad de los plásmidos, se procedió a realizar restricciones con las enzimas *Kpn* I y *Eco* RV para verificar la inserción de DBD_{Gal4} en dirección 5’→3’ en el vector de expresión, como se muestra en la Fig. 29, en donde se observa la liberación del inserto de aproximadamente 600 pb correspondiente a la secuencia de DBD_{Gal4} y del vector de expresión con un tamaño de 6.1 Kb.

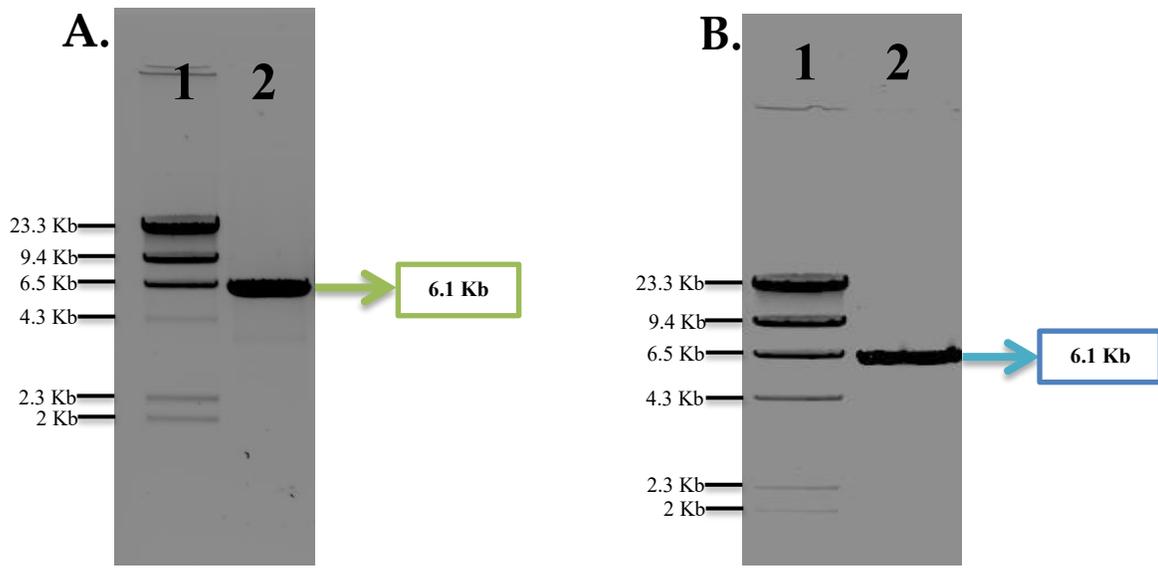


Fig. 28. Identificación por ensayos de restricción con *Hind* III de los plásmidos pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD. A. Gel de agarosa que muestra el resultado de la restricción del plásmido pcDNA3.1-GFP-DBD. 1) Marcador de peso molecular λ *Hind* III, 2) pcDNA3.1-GFP-DBD con *Hind* III. B. Gel de agarosa que muestra el resultado de la restricción del plásmido pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD con *Hind* III. 1) Marcador de peso molecular y 2) pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD con *Hind* III.

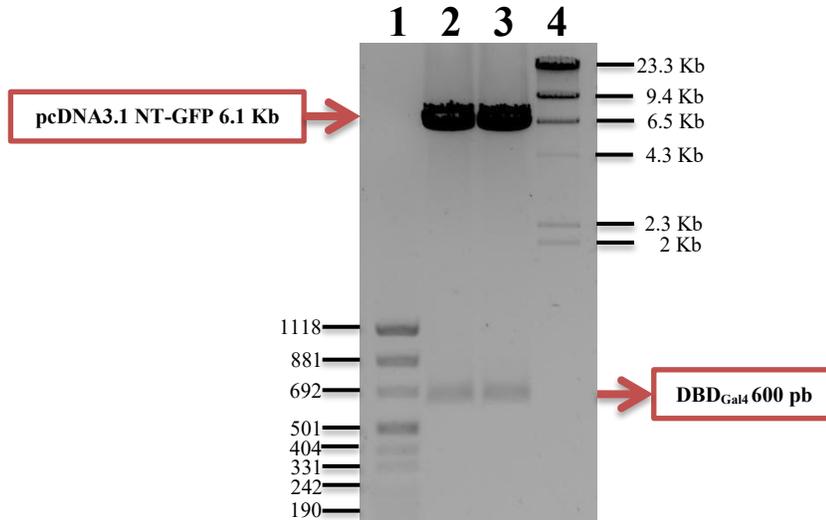


Fig. 29. Restricción con *Kpn* I y *Eco* RV de los plásmidos pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD. Gel de agarosa que muestra el resultado de la restricción. 1) Marcador de peso molecular, 2) pcDNA3.1-GFP-DBD con *Kpn* I-*Eco* RV, 3) pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD con *Kpn* I-*Eco* RV, 4) Marcador de peso molecular λ *Hind* III.

Posterior a la corroboración de la identidad de los plásmidos, se llevó a cabo la transformación de *E. coli* DH5 α . Las clonas adquiridas se crecieron en medio líquido LB durante 16 h a 37 °C; se obtuvo el paquete celular, al cual se le realizó extracción de ADN plasmídico. Este ADN se sometió a ensayos de amplificación por PCR y análisis de restricción con las enzimas *Eco* RV y *Kpn* I. Se analizó el ADN plasmídico de 4 clonas denominadas como: 3, 8, 11 y 15, las cuales mostraron que contenían los plásmidos deseados (pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD), como se muestra en la Fig. 30, en donde se puede observar que todas las clonas seleccionadas dieron positivo a la amplificación por PCR utilizando los iniciadores fDBDKpnI y rDBDEcoRV, obteniéndose un amplicón de 555 pb. Así mismo, se observan las bandas esperadas por el análisis de restricción liberándose un fragmento de aproximadamente 600 pb y el vector de expresión con un tamaño de 6.1 Kb.

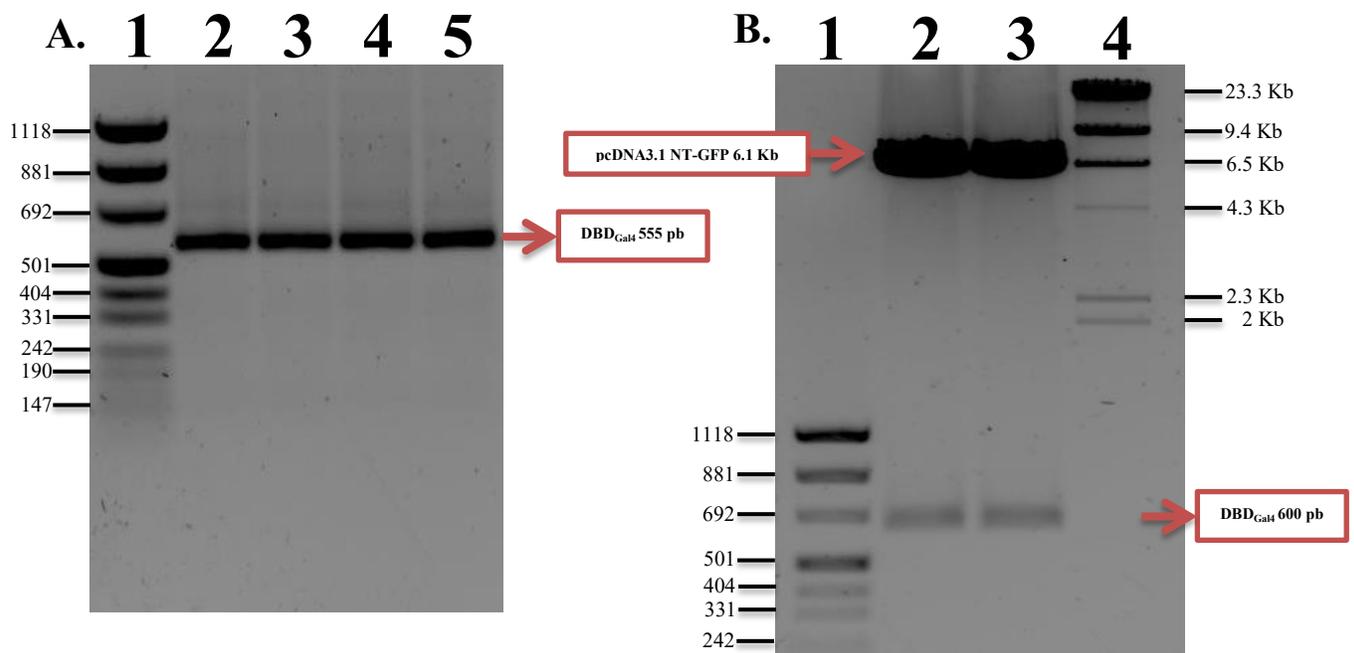
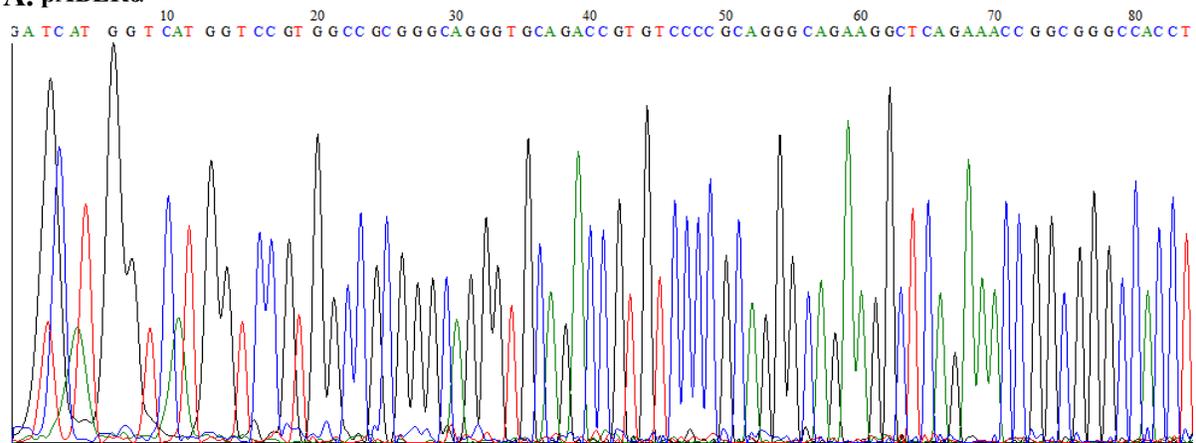


Fig. 30. Comprobación de la transformación de las clonas por PCR y restricción con *Kpn* I y *Eco* RV. Gel de agarosa que muestra el resultado de la restricción con *Kpn* I y *Eco* RV. **A. PCR.** 1) Marcador de peso molecular, 2) PCR clona 3, 3) PCR clona 8, 4) PCR clona 11, 5) PCR clona 15. **B. Restricciones.** 1) Marcador de peso molecular 2) Restricción clona 8 con *Kpn* I-*Eco* RV, 3) Restricción clona 11 con *Kpn* I-*Eco* RV y 4) Marcador de peso molecular lambda *Hind* III.

8.11 Secuenciación de los plásmidos: pGL3-pABER α , pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD.

Cada uno de los plásmidos obtenidos (pGL3-pABER α , pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD) se sometió a análisis de secuenciación, con el fin de confirmar que las secuencias clonadas dentro de cada uno de los vectores correspondieran a los promotores A y B del ER α (pABER α) y al dominio de unión a ADN del factor transcripcional Gal4 (DBD_{Gal4}) de levaduras. Para realizar la reacción de secuenciación se utilizaron iniciadores sentido y antisentido de cada una de las secuencias clonadas dentro de los vectores. Cada iniciador correspondía a una reacción independiente de secuenciación ya que esta técnica enzimática, a diferencia de una PCR convencional, utiliza sólo un iniciador y se agregan dideoxinucleótidos (ddNTPs), los cuales están marcados con fluoróforos. En el momento en que se incorpora un dideoxinucleótido a la cadena de elongación se detiene la amplificación, dando como resultado amplicones de distinta longitud, cada uno terminando en un ddNTP. Los fragmentos obtenidos se separan y se analizan electroforéticamente de manera automática y mediante un láser se detecta a cada uno de los ddNTPs marcados con su respectivo fluoróforo, cuya fluorescencia es interpretada por el equipo en forma de un pico generando un electroferograma de cada uno de los fragmentos generados. Los electroferogramas se visualizaron en el programa “*BioEdit*”. En la Fig. 31. A-B se muestra los electroferogramas visualizados con “*BioEdit*”, donde se observa parte de la secuencia obtenida por reacción de secuenciación del plásmido pGL3-pABER α , que contiene inserto a los promotores A y B del ER α .

A. pABER α



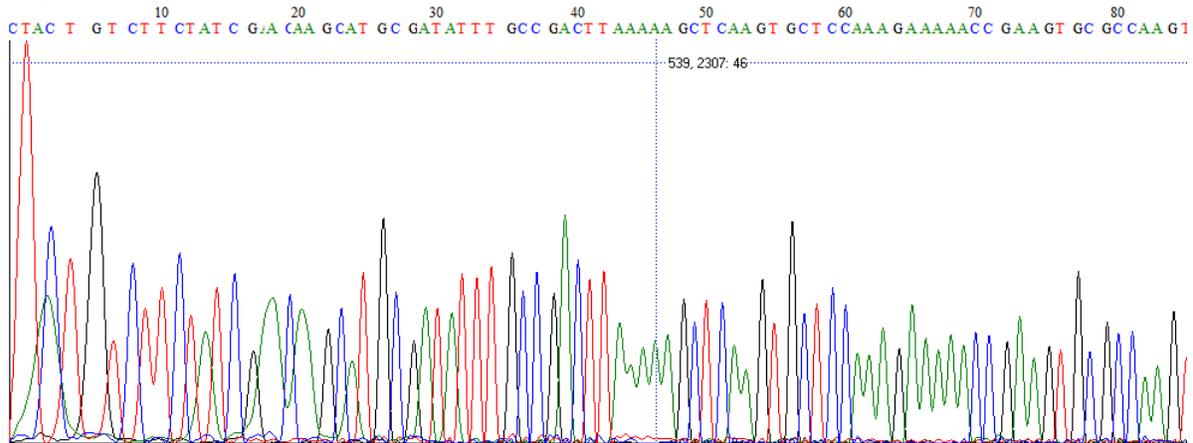
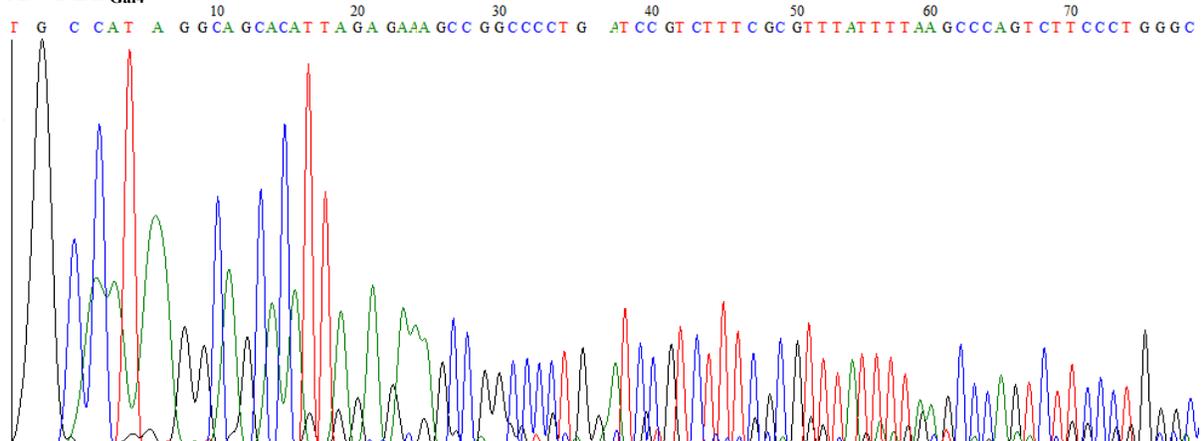
B. pABER α 

Fig. 31. Electroferogramas del plásmido pGL3-pABER α . A. Electroferograma de pGL3-pABER α generado a partir de la amplificación con ESR1-31 *Hpa* I. B. Electroferograma de pGL3-pABER α generado con ESR1-22 *Xho* I.

En la Fig. 32. A-B se muestra los electroferogramas visualizados con “*BioEdit*”, donde se observa parte de la secuencia obtenida por reacción de secuenciación de los plásmidos pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD, que contienen el inserto del dominio de unión a ADN del factor transcripcional Gal4 (DBD_{Gal4}).

A. DBD_{Gal4}

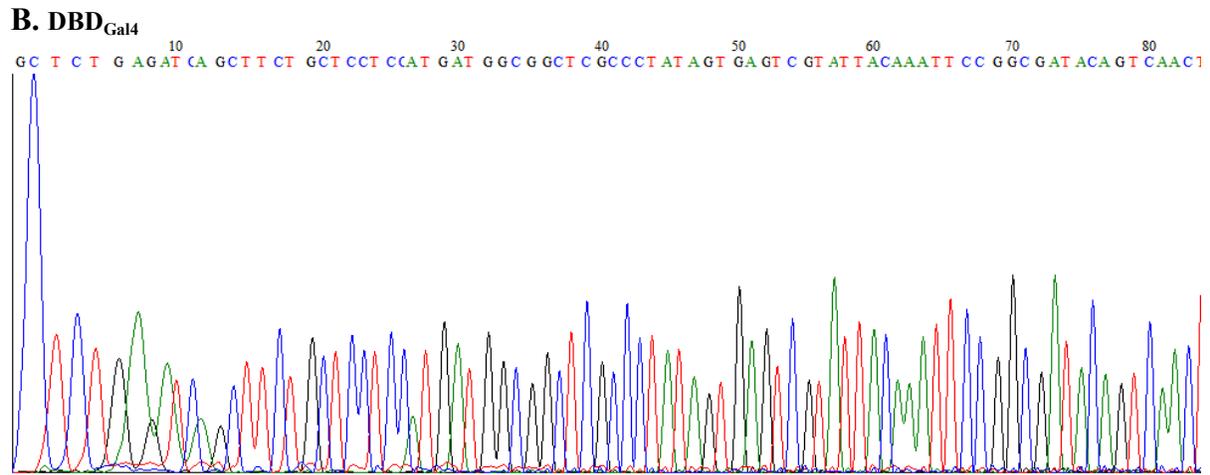


Fig. 32. Electroferogramas de los plásmidos pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD. A. Electroferograma de pcDNA3.1-GFP-DBD generado a partir de la amplificación con fDBDKpnI. **B.** Electroferograma de pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD generado con rDBDEcoRV.

8.12 Análisis bioinformático de la secuenciación

Una vez obtenidas las secuencias de interés, se llevó a cabo un análisis comparativo “*in silico*” con las secuencias disponibles en las bases de datos públicas. Las secuencias se sometieron a BLAST (“*Basic Local Alignment Search Tool*”, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para verificar que la secuencia obtenida correspondiera al fragmento que se esperaba. El análisis BLAST de la secuencia del plásmido pGL3-pABER α mostró una identidad del 98% con la región promotora del gen ESR1 humano difiriendo sólo en 9 pares de bases, como se muestra en la Fig.33. Para la secuencia obtenida de los plásmidos pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD se obtuvieron datos con una identidad del 99% con parte de la secuencia genómica del factor transcripcional Gal4 de *S. cerevisiae*, difiriendo en sólo 3 pares de bases, como se muestra en la Fig. 34.

Homo sapiens estrogen receptor 1 (ESR1), RefSeqGene on chromosome 6
 Sequence ID: [ref|NG_008493.1|](#) Length: 419778 Number of Matches: 1

Range 1: 121857 to 122401		GenBank	Graphics	Next Match	Previous
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
955 bits(517)	D.0	536/545(98%)	1/545(0%)	Plus/Plus	
Query 2	GCA	ATAAGGCAGCACATTAGAGAAAAGCCGGCCCCCTGGATCCGTCTTTCCGCTTTATTTT			68
Sbjct 121857	GCA	ATAAGGCAGCACATTAGAGAAAAGCCGGCCCCCTGGATCCGTCTTTCCGCTTTATTTT			121916
Query 61	AAGCC	CAGTCTTCCCTGGGCCACCTTTAGCAGATCCTCGTGGCCCCCGCCCCCTGGCCG			128
Sbjct 121917	AAGCC	CAGTCTTCCCTGGGCCACCTTTAGCAGATCCTCGTGGCCCCCGCCCCCTGGCCG			121976
Query 121	TGAA	ACTCAGCCTCTATCCAGCAGCGACGACAAGTAAAGTAAAGTTAGGGAAGCTGCTC			188
Sbjct 121977	TGAA	ACTCAGCCTCTATCCAGCAGCGACGACAAGTAAAGTAAAGTTAGGGAAGCTGCTC			122036
Query 181	TTTGG	ATCGCTCCAAATCGAGTTGTGCCTGGAGTGTATGTTTAAAGCCAATGTGAGGSCAA			248
Sbjct 122037	TTTGG	ATCGCTCCAAATCGAGTTGTGCCTGGAGTGTATGTTTAAAGCCAATGTGAGGSCAA			122096
Query 241	GGCA	ACAGTCCCTGGCCGTCTCCAGCACCTTTGTAATGCATATGAGCTCGGGAGACCAG			308
Sbjct 122097	GGCA	ACAGTCCCTGGCCGTCTCCAGCACCTTTGTAATGCATATGAGCTCGGGAGACCAG			122156
Query 301	TACTT	AAAAGTTGGAGGCCCGGGAGCCAGGAGCTGGCGGAGGGCGTTCGTCTGGGACTG			368
Sbjct 122157	TACTT	AAAAGTTGGAGGCCCGGGAGCCAGGAGCTGGCGGAGGGCGTTCGTCTGGGACTG			122216
Query 361	CAC	TTGCTCCCGTGGGTGACCCGGCTTCAACAGACCTTCAAGCTCCCGGGCAGGGCCG			428
Sbjct 122217	CAC	TTGCTCCCGTGGGTGACCCGGCTTCAACAGACCTTCAAGCTCCCGGGCAGGGCCG			122276
Query 421	GGSC	CAGAGTCCCGTGTGGSCGGGACATGCGCTGCGTCCCTCTAACCTCGGGCTGTGC			488
Sbjct 122277	GGSC	CAGAGTCCCGTGTGGSCGGGACATGCGCTGCGTCCCTCTAACCTCGGGCTGTGC			122336
Query 481	TCTTT	TCCAGSTGGCCCGCCGGTTTCTGAGCCTTCTGACCTGCAAGAACACGGTCTGCA			548
Sbjct 122337	TCTTT	TCCAGSTGGCCCGCCGGTTTCTGAGCCTTCTGACCTGCAAGAACACGGTCTGCA			122396
Query 541	CCCTG	545			
Sbjct 122397	CCCTG	122401			

Homo sapiens estrogen receptor 1 (ESR1), RefSeqGene on chromosome 6

NCBI Reference Sequence: [NG_008493.1](#)

[GenBank](#) [FASTA](#)

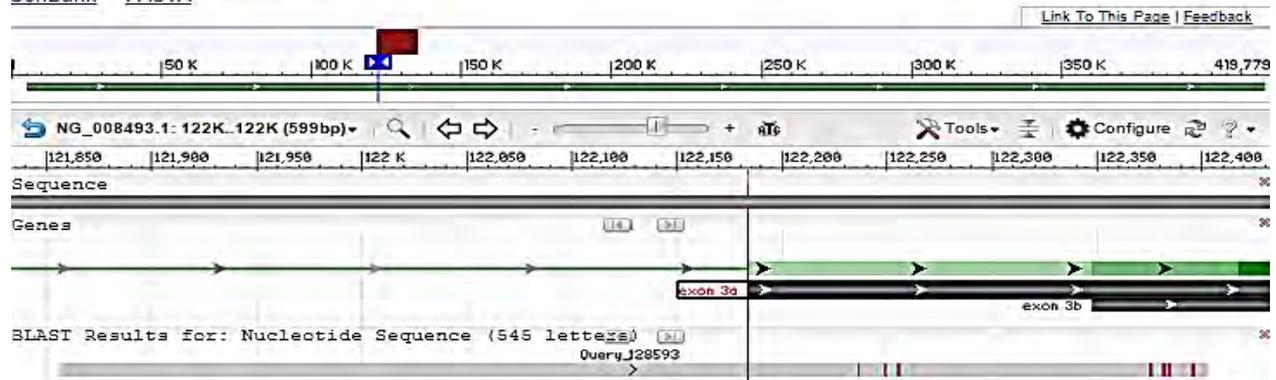


Fig. 33. BLAST de la secuenciación de pGL3-pABERα. Se muestra que el análisis bioinformático arrojó una identidad del 98% con parte de la secuencia del receptor de estrógenos alfa humano disponible en la red.

Saccharomyces cerevisiae YPL248C/GAL4 gene for transcription factor, strain 6320-A7
Sequence ID: [emb|LN831877.1](#) Length: 2646 Number of Matches: 1

Range 1: 86 to 441 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
641 bits(347)	0.0	354/357(99%)	2/357(0%)	Plus/Plus
Query 69	CCAASTGTCTGAAGAACAACTGGGAGTGTGCTACTCTCCCAAACCAAAGGCTCCGC	128		
Sbjct 86	CCAASTGTCTGAAGAACAACTGGGAGTGTGCTACTCTCCCAAACCAAAGGCTCCGC	145		
Query 129	TGACTAGGGCACATCTGACAGAASTGGAATCAAGGCTAGAAAGACTGGAACAGCTATTTC	188		
Sbjct 146	TGACTAGGGCACATCTGACAGAASTGGAATCAAGGCTAGAAAGACTGGAACAGCTATTTC	285		
Query 189	TACTGATTTTCTCTGAGAAGACCTTGACATGATTTTGAAAATGGATCTTTACAGGAT	247		
Sbjct 285	TACTGATTTTCTCTGAGAAGACCTTGACATGATTTTGAAAATGGATCTTTACAGGAT	264		
Query 248	ATAAAAGCATTGTTAACAGGATTATTTGTACAAGATAATGTGAATAAGATGCCGTCACA	387		
Sbjct 265	ATAAAAGCATTGTTAACAGGATTATTTGTACAAGATAATGTGAATAAGATGCCGTCACA	324		
Query 388	GATAGATTGGCTTCAGTGGAGACTGATATGCCTCTAACATTGAGACAGCATAGAATAAGT	357		
Sbjct 325	GATAGATTGGCTTCAGTGGAGACTGATATGCCTCTAACATTGAGACAGCATAGAATAAGT	384		
Query 368	GCGACATCATCAGGAGAGASTAGTAACAAAGGTCAAAGACAGTTGACTGATTCG	424		
Sbjct 385	GCGACATCATCAGGAGAGASTAGTAACAAAGGTCAAAGACAGTTGACTGATTCG	441		

Saccharomyces cerevisiae YPL248C/GAL4 gene for transcription factor, strain 6320-A7

GenBank: LN831877.1

GenBank [FASTA](#)

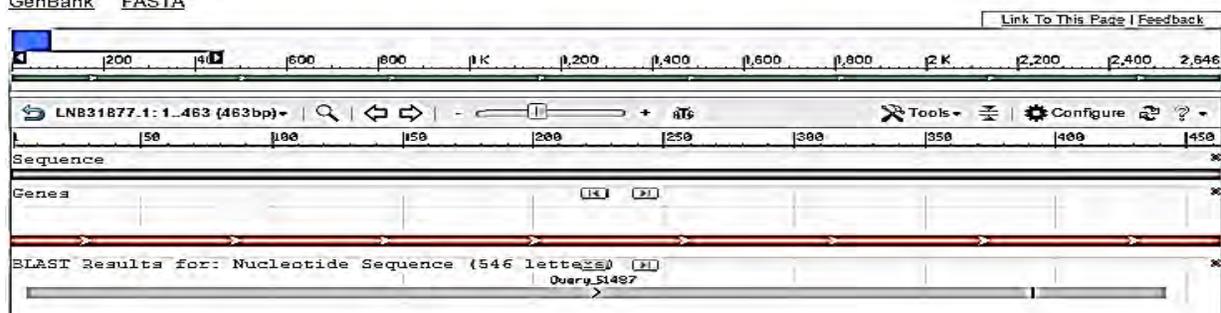


Fig. 34. BLAST de la secuenciación de pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD. Se muestra que el análisis bioinformático arroja una identidad del 99% con parte de la secuencia del gen codificante del factor transcripcional Gal4 de la cepa *S. cerevisiae*.

8.13 Transfección de pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD en la línea celular HEK-293T

Con los resultados obtenidos, se inició la transfección de los plásmidos pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD en la línea celular HEK-293T. Para la transfección se evaluaron 5 condiciones: 1) control negativo de transfección, que consistió en realizar todo el procedimiento experimental sobre HEK-293T omitiendo la adición de ADN en los reactivos; 2) control positivo de la transfección, al cual se le adicionó el plásmido pReceiver, del que se conoce su buena aceptación en células receptoras, además su visualización por microscopia es sencilla ya que contiene GFP (proteína verde fluorescente); 3) plásmido control pcDNA3.1/NT-GFP, que contiene GFP 4) plásmido pcDNA3.1-GFP-DBD; y 5) pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD. La transfección se visualizó mediante microscopia de fluorescencia con el fin de observar la expresión de la proteína recombinante fusionada a GFP y así valorar de manera indirecta la eficiencia de transfección en HEK-293T. Como se observa en el siguiente panel de micrografías obtenidas con el microscopio invertido Olympus/ IX-71 (Fig. 35) la comparación entre una imagen obtenida por fluorescencia y la superposición o “merge” entre las imágenes de fluorescencia y campo claro, aunque se obtuvo una alta eficiencia de transfección, no todas las células expresan GFP. No obstante, las imágenes obtenidas para las células transfectadas con los plásmidos pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD muestran que la expresión de GFP se restringe a compartimientos celulares específicos. Para demostrar lo anterior, las células transfectadas con pcDNA3.1-GFP-DBD, pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD y pcDNA3.1-GFP (como control) se tiñeron con el colorante fluorescente de ADN “Hoechst-33342” (Life technologies, Carlsbad, CA, EUA, No. Cat. H3570) para la tinción de núcleos, mostrando que la expresión de la proteína recombinante GFP-DBD se delimita subcelularmente al núcleo, como se observa en la Fig. 36.

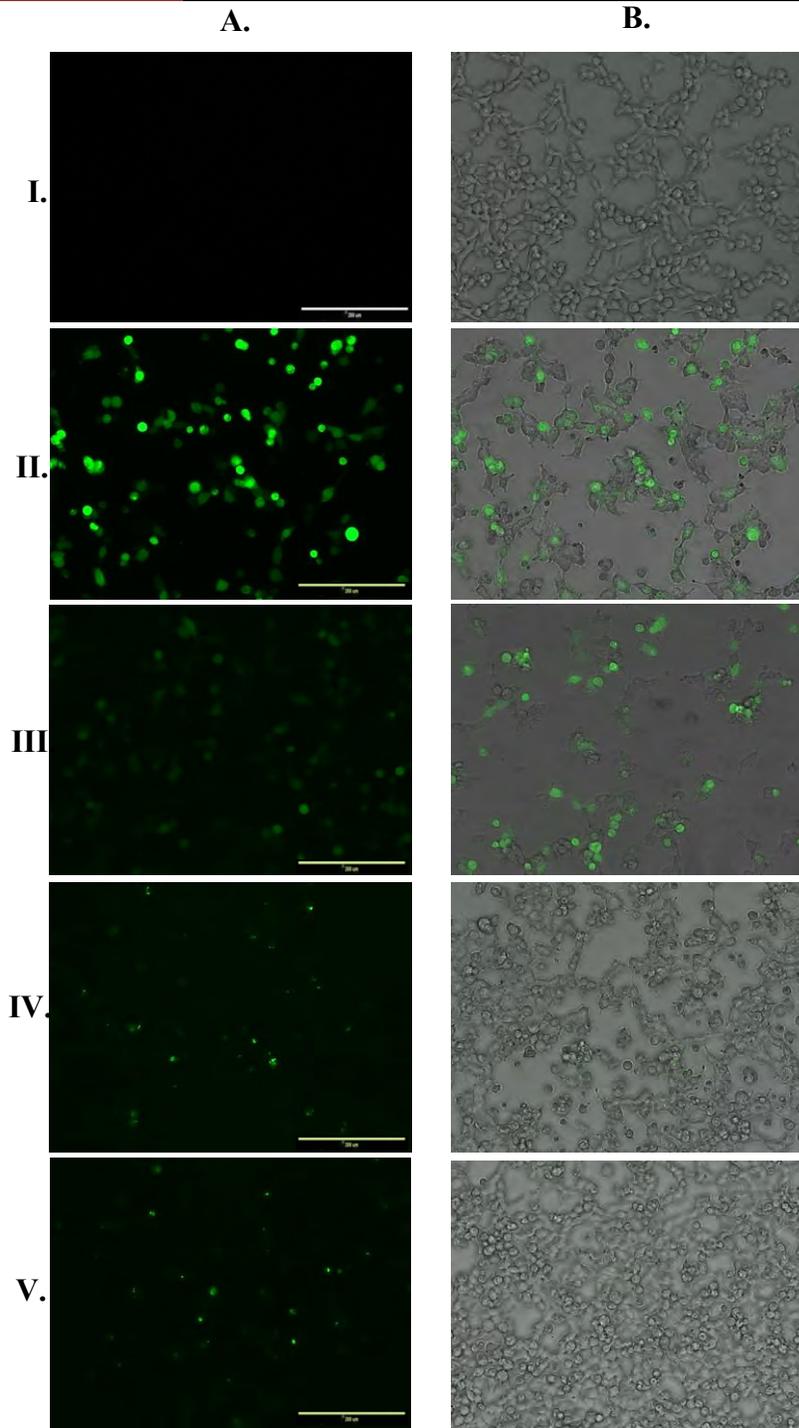


Fig. 35. Micrografías de fluorescencia y sobreposición o “merge” de HEK-293T transfectadas. Todos los campos observados a la misma distancia focal, teniendo como punto de referencia una escala de 400 μm (barra blanca en el extremo inferior derecho). **A.** Microscopía de fluorescencia. I) HEK-293T sin ADN transfectado (control negativo), II) HEK-293T con pReceiver (control positivo), III) HEK-293T con pcDNA3.1-GFP, IV) HEK-293T con pcDNA3.1-GFP-DBD y V) HEK-293T con pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD. **B.** Sobreposición o “merge” de la imagen de fluorescencia con la imagen de campo claro. I) HEK-293T sin ADN transfectado (control negativo), II) HEK-293T con pReceiver (control positivo), III) HEK-293T con pcDNA3.1-GFP, IV) HEK-293T con pcDNA3.1-GFP-DBD y V) HEK-293T con pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD

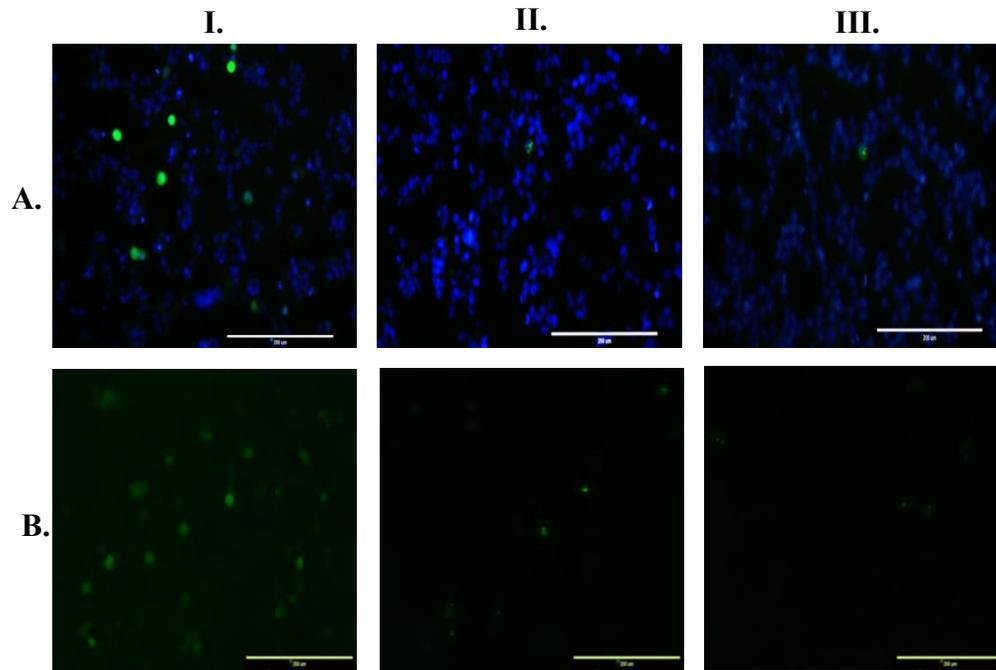


Fig. 36. Micrografía de fluorescencia de células HEK-293T transfectadas teñidas con *Hoechst-33342*. Todos los campos se observados a la misma distancia focal, teniendo como punto de referencia una escala de 200 μm (barra blanca en el extremo inferior derecho). **A.** Microscopía de fluorescencia de la tinción nuclear con *Hoechst-33342*. I) HEK-293T con pcDNA3.1-GFP, II) HEK-293T con pcDNA3.1-GFP-DBD y III) HEK-293T con pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD. **B.** Microscopía de fluorescencia sin tinción nuclear. I) HEK-293T con pcDNA3.1-GFP, II) HEK-293T con pcDNA3.1-GFP-DBD y III) HEK-293T con pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD.

Así mismo, se realizó citometría de flujo para determinar cuantitativamente el porcentaje de células transfectadas en las diferentes condiciones evaluadas, ya que en microscopía se observaron diferentes intensidades de fluorescencia. Los resultados de la citometría de flujo se muestran en los siguientes histogramas obtenidos por el *software CellQuest* perteneciente al equipo de citometría FACScan.(Fig. 37), los ejes de las abscisas de los histogramas se escalan de forma logarítmica representando la intensidad de fluorescencia, mostrando un incremento de 100, 10, 2.5 y 3 veces de las células transfectadas con los plásmidos pReceiver, pcDNA3.1-GFP, pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD, respectivamente, en comparación con el control.

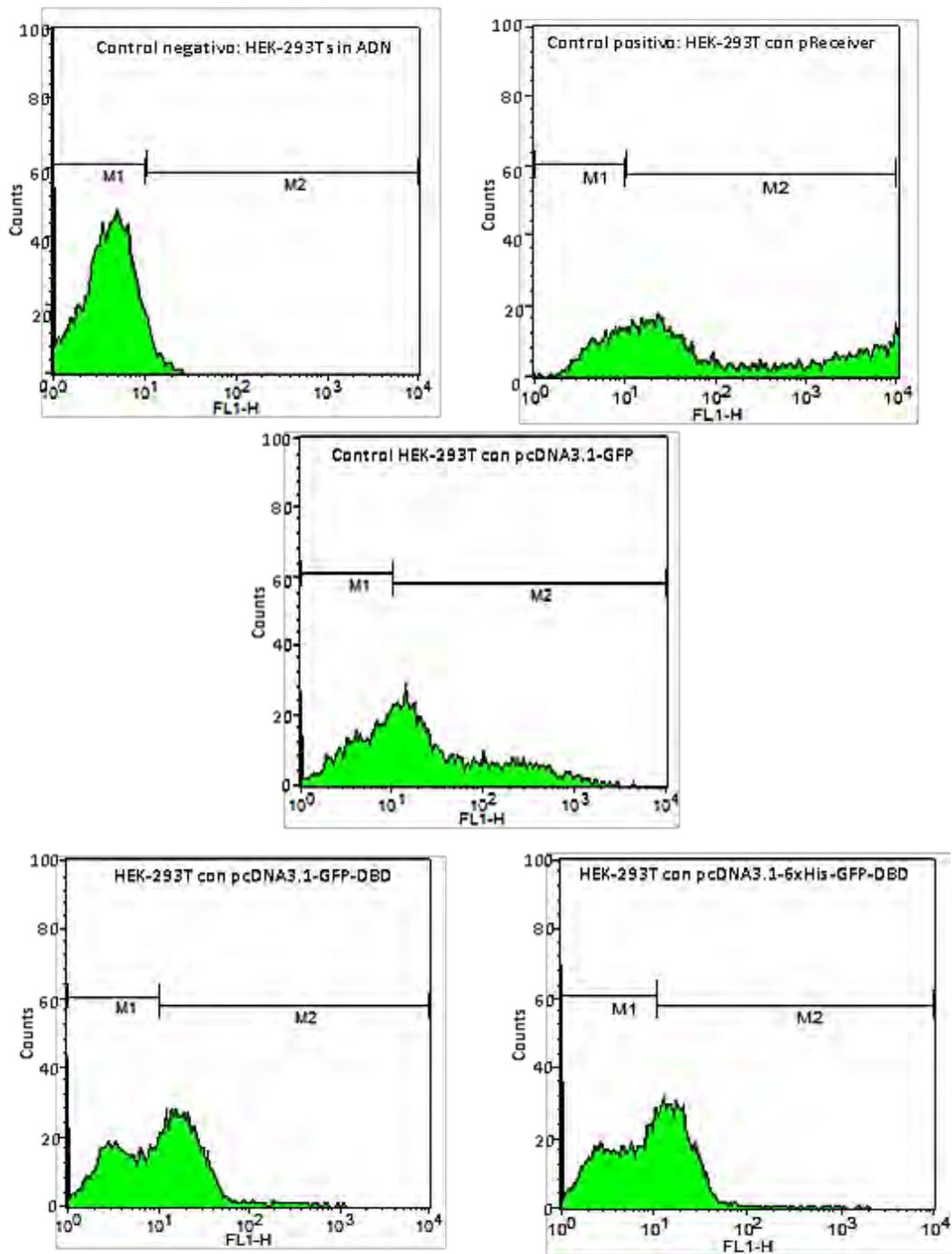


Fig. 37. Histogramas de la citometría de flujo de las células HEK-293T sin transfectar o transfectadas con las diferentes construcciones. M1: región de intensidad de fluorescencia considerada como autofluorescencia. M2: región de intensidad de fluorescencia considerada como positiva para la expresión de GFP.

A continuación se muestra la tabla donde se enlistan los datos obtenidos en la citometría de flujo (Tabla 8)

Condición	Porcentaje de células fluorescentes (Transfectadas)	Media de Fluorescencia
1. HEK-293T sin ADN	6.5 %	13.5
2. HEK-293T/pReceiver	73 %	1631
3. HEK-293T/control pcDNA3.1-GFP	63 %	134
4. HEK-293/pcDNA3.1-GFP-DBD	53 %	39
5. HEK-293/pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD	48 %	40

Tabla 8. Resumen de datos de la citometría de flujo

8.14 Extracción de ARN y RT-PCR de HEK-293 transfectadas

Una vez verificada la transfección y emisión de fluorescencia de las células HEK-293T en las diferentes condiciones, una parte del cultivo fue sometido a extracción de ARN. La integridad del ARN total y la ausencia de ADN genómico contaminante fueron evaluadas mediante la separación electroforética del ARN ribosomal en gel de agarosa desnaturalizante al 1 % en presencia de formaldehído al 5 %, teñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), como se muestra en la Fig. 38, donde se muestran las bandas correspondientes al ARN 28s, 18S, 5S. De igual modo, se verificó la ausencia de proteínas contaminantes así como la concentración y rendimiento con una lectura espectrofotométrica a 260 nm y 280 nm UV.

Para corroborar los datos generados por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo, que nos indican que hay expresión de la proteína recombinante GFP-DBD, se realizó una RT-PCR, utilizando las condiciones anteriormente estandarizadas en la amplificación de DBD_{Gal4} mediante PCR. Para dicho procedimiento se ocuparon los iniciadores fDBDKpnI y rDBDEcoRV. Como se muestra en la Fig. 39 A., no se obtuvo el amplicón esperado de 555 pb, no obstante se logró amplificar el DBD_{Gal4} del control positivo, correspondiente a los plásmidos pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD. Pensando en un procedimiento erróneo de extracción de ARN total, se realizó la amplificación por RT-PCR del ARNm de la enzima glucolítica gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), un gen de expresión constitutiva. Como se muestra en la Fig. 39 B, se obtuvo el amplicón

esperado de 429 pb en cada una de las condiciones evaluadas, descartando así la posibilidad de un mal manejo de las muestras.

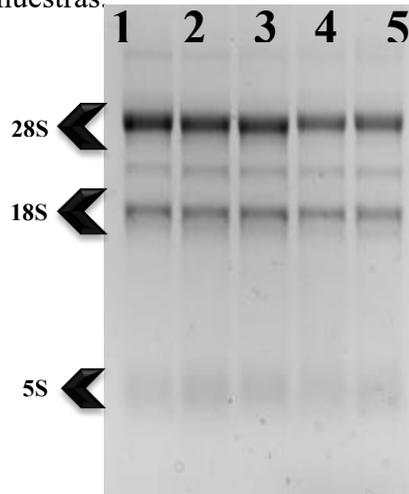


Fig. 38. Extracción de ARN total de HEK-293T Transfectadas. Gel desnaturalizante de agarosa teñido con BrEt que muestra el análisis electroforético de la extracción de ARN total de los cultivos de HEK-293T transfectadas. 1) HEK-293T sin ADN transfectado, 2) HEK-293T con pReceiver, 3) HEK-293T con pcDNA3.1-GFP, 4) HEK-293T con pcDNA3.1-GFP-DBD y 5) HEK-293T con pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD.

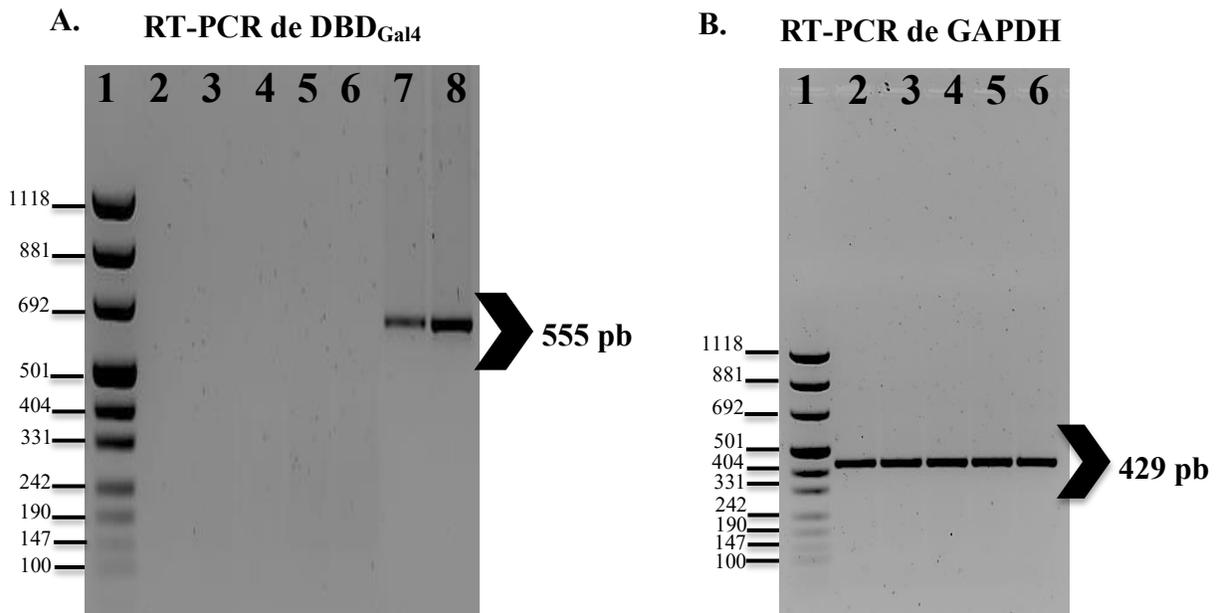


Fig. 39. Análisis electroforético de la RT-PCR de DBD y GAPDH. **A.** RT-PCR de DBD_{Gal4} evaluada en las diferentes condiciones: 1) Marcador de peso molecular pUC Mix, 2) HEK-293T sin ADN transfectado, 3) HEK-293T con pReceiver, 4) HEK-293T con pcDNA3.1-GFP, 5) HEK-293T con pcDNA3.1-GFP-DBD, 6) HEK-293T con pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD, 7) Plásmido pcDNA3.1-GFP-DBD y 8) Plásmido pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD. **B.** RT-PCR de GAPDH evaluada en las diferentes condiciones: 1) Marcador de peso molecular pUC Mix, 2) HEK-293 sin ADN, 3) HEK-293T con pReceiver, 4) HEK-293T con pcDNA3.1-GFP, 5) HEK-293T con pcDNA3.1-GFP-DBD y 7) HEK-293T con pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD.

8.15 *Western-blot* de HEK-293T transfectadas.

Con base en los datos obtenidos en la RT-PCR, se realizó un análisis de *Western-blot* para corroborar que la proteína recombinante que contiene GFP y el dominio de unión a ADN del factor transcripcional Gal4 (GFP-DBD_{Gal4}) se estuvieran expresando en las células transfectadas con los plásmidos pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD. La expresión de la proteína fue evaluada con un anticuerpo monoclonal dirigido contra GFP y este, a su vez, reconocido por un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). De igual modo, se realizó un *Western-blot* con un anticuerpo policlonal dirigido a DBD_{Gal4} para confirmar su presencia, ocupando un anticuerpo secundario anti IgG de conejo acoplado a HRP. Como se muestra en la Fig. 41, sólo se observó la banda esperada con un peso de 47 KDa en el extracto proteico de las células transfectadas con los plásmidos pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD. La finalidad de utilizar un anticuerpo monoclonal dirigido contra GFP, es su reconocimiento de un epítipo específico; además, el utilizar un anticuerpo contra GFP nos permitió observar el cambio de peso entre una proteína nativa de GFP y una de mayor peso debido a la suma de los aminoácidos correspondientes al DBD_{Gal4}. Como se muestra en la Fig. 40, se obtuvieron bandas con pesos moleculares de 25 KDa, 47 KDa y 30-37-40-50-60-80 KDa, que corresponden al peso estándar de GFP, GFP fusionada a diferentes etiquetas de GFP y GFP fusionada al DBD_{Gal4}, respectivamente. Como control de cargado se analizó la presencia de las proteínas constitutivas β -actina y α -tubulina (Fig. 40-41).

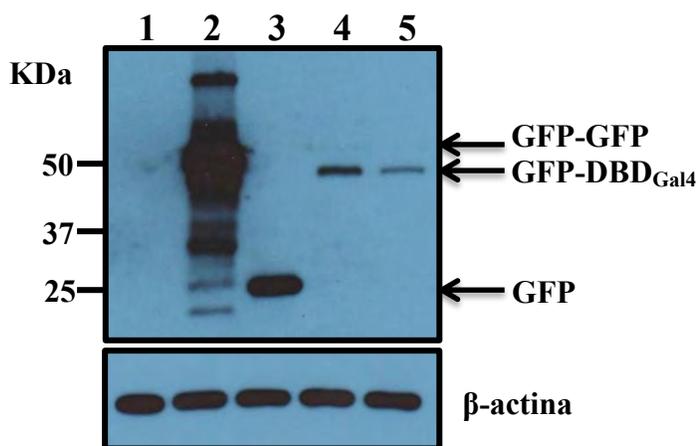


Fig. 40. *Western-Blot* con anticuerpo dirigido a GFP de HEK-293T Transfectadas. Se cargaron 5 μ g de proteína total para cada condición. 1) HEK-293T sin ADN transfectado (control negativo), 2) HEK-293T con

pReceiver (control positivo), 3) HEK-293T con pcDNA3.1-GFP (control), 4) HEK-293T con pcDNA3.1-GFP-DBD y 5) HEK-293T con pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD.

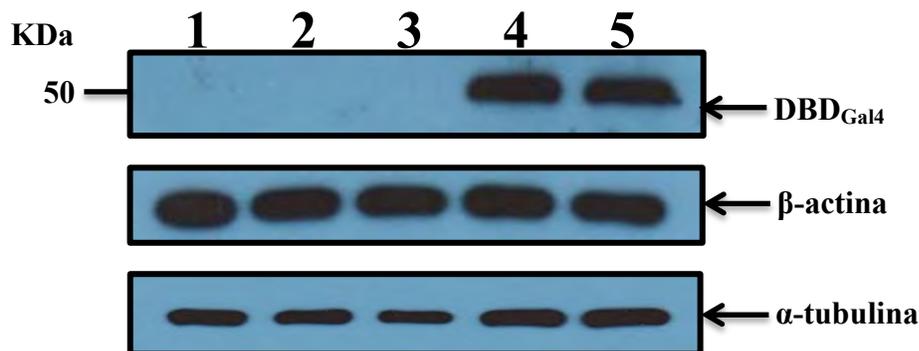


Fig. 41. *Western-blot* con anticuerpo dirigido a DBD_{Gal4} de HEK-293T transfectadas. Se cargaron 5 µg de proteína total para cada condición. 1) HEK-293T sin ADN transfectado (control negativo), 2) HEK-293T con pReceiver (control positivo), 3) HEK-293T con pcDNA3.1-GFP (control), 4) HEK-293T con pcDNA3.1-GFP-DBD y 5) HEK-293T con pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD.

8.16 Transfección de pGL3-pABER α en la línea celular HEK-293T

Una vez obtenida la secuenciación y el análisis bioinformático, se realizó la transfección del plásmido pGL3-pABER α en la línea celular HEK-293T. Para la transfección se evaluaron 3 condiciones: 1) control negativo de transfección, que consistió en realizar todo el procedimiento experimental sobre HEK-293T omitiendo la adición de ADN plasmídico en los reactivos, 2) control positivo de la transfección, al cual se le adicionó el plásmido pReceiver, del que se conoce su buena aceptación en células receptoras; además su visualización por microscopia es sencilla ya que contiene la GFP (proteína verde fluorescente), 3) plásmido pGL3- pABER α que contiene la secuencia de los promotores A y B del receptor de estrógenos alfa que además tiene como reportero a la luciferasa. La transfección se visualizó mediante microscopía de fluorescencia (microscopio invertido Olympus/ IX-71) con el fin de observar la expresión de GFP del control positivo y así valorar de manera indirecta la eficiencia de transfección en HEK-293T, como se observa en el siguiente panel de imágenes (Fig. 42 A–B).

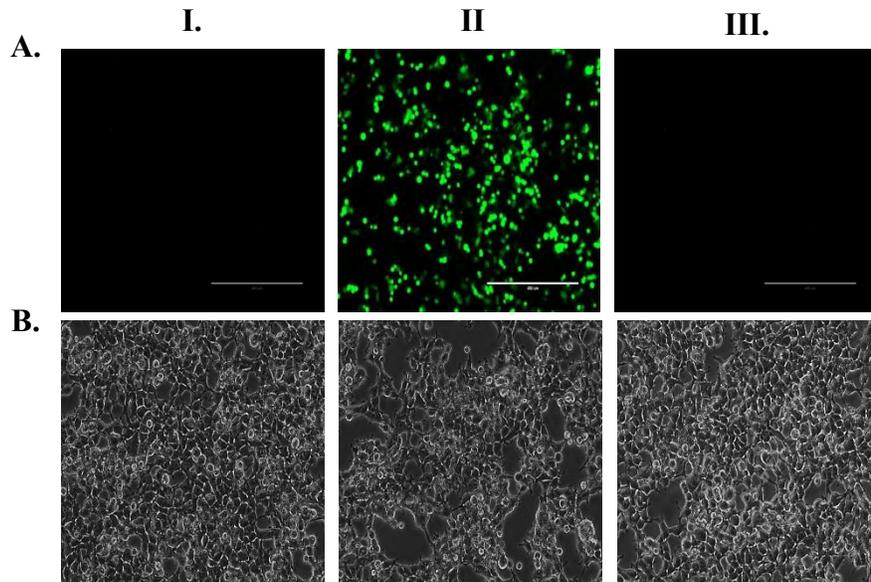


Fig. 42. Microscopía de fluorescencia y campo claro de HEK-293T transfectadas. Todos los campos fueron observados a 10X. **A. Microscopía de fluorescencia.** I) HEK-293T sin ADN transfectado (control negativo), II) HEK-293T con pReceiver (control positivo) y III) HEK-293T con pGL3-pABER α . **B. Microscopía de campo claro.** I) HEK-293T sin ADN transfectado (control negativo), II) HEK-293T con pReceiver (control positivo) y III) HEK-293T con pGL3-pABER α .

8.17 Extracción de ARN y RT-PCR de HEK-293 Transfectadas con pGL3-pABER α

Una vez verificada la transfección por microscopía, se realizó la extracción de ARN. La integridad del ARN total y la ausencia de ADN genómico contaminante se evaluaron mediante la separación electroforética del ARN ribosomal en gel de agarosa desnaturalizante al 1 % en presencia de formaldehído al 5 %, teñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). En la Fig. 43, se muestran las bandas correspondientes al ARN 28s, 18S, 5S. Cabe mencionar la aparición de una banda de ARN en los carriles 2 y 3 (entre los ARNs ribosomales 28S y 18S), la ausencia de barrido en los carriles 2 y 3 sugiere que esta banda no es producto de degradación sino de la expresión ectópica ocasionada por la transfección de los plásmidos. De igual modo, se verificó la ausencia de proteínas contaminantes así como la concentración y rendimiento con una lectura espectrofotométrica a 260 nm y 280 nm UV.

Para corroborar los datos adquiridos por microscopía, que nos indican que hubo transfección, se efectuó una RT-PCR, utilizando las condiciones anteriormente

estandarizadas de la amplificación de pABER α ocupando los iniciadores 1-31HpaI de pBER α y 1-22XhoI de pAER α . Como se muestra en la Fig. 44. A, se amplificó el fragmento esperado de 650 pb correspondiente al tamaño de la secuencia de pABER α . De igual modo, se logró amplificar a la luciferasa con un tamaño de 1.6 Kb (Fig. 44. B), corroborando la exitosa transfección del plásmido pGL3-pABER α , además, la amplificación del ARNm de la luciferasa a partir del ADNc indica que los promotores A y B del receptor de estrógenos se encuentran activos, ya que el sistema comercial de clonación pGL3 carece de promotores. Asimismo, se realizó la amplificación por RT-PCR del ARNm de la enzima glucolítica gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), un gen constitutivo, como control para la normalización de la muestra en la determinación de los niveles de ARNm, obteniéndose el fragmento esperado de 429 pb (Fig. 45).

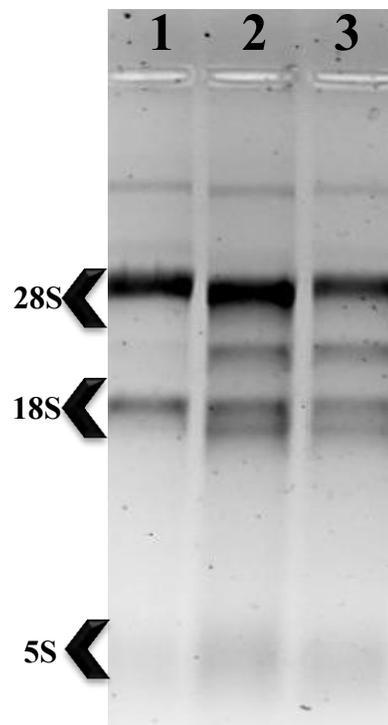


Fig. 43. Extracción de ARN total de HEK-293T transfectadas. Análisis electroforético de la extracción de ARN total de los cultivos de HEK-293T transfectadas. 1) HEK-293T sin ADN transfectado, 2) HEK-293T con pReceiver (control positivo) y 3) HEK-293T con pGL3-pABER α .

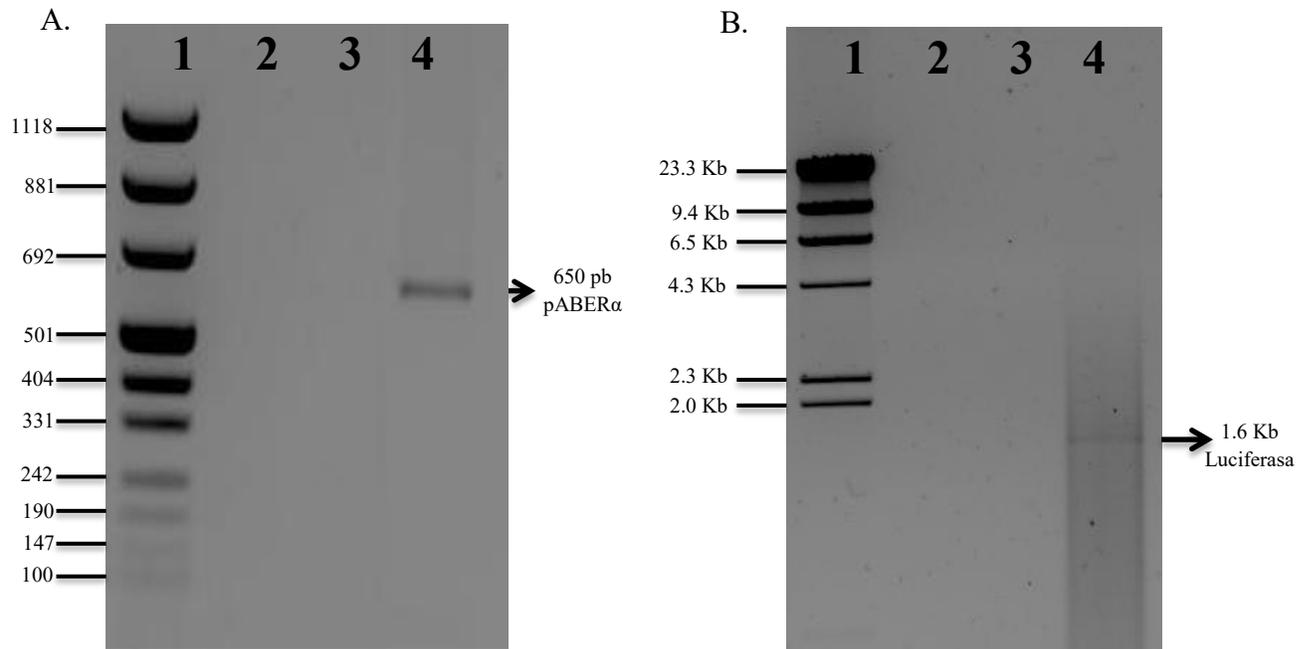


Fig. 44. Análisis electroforético de la RT-PCR de pABER α y luciferasa. A. RT-PCR de pABER α evaluada en las diferentes condiciones: 1) Marcador de peso molecular pUC Mix, 2) HEK-293T sin ADN transfectado, 3) HEK-293T con pReceiver y 4) HEK-293T con pABER α . B. RT-PCR de luciferasa evaluada en las diferentes condiciones: 1) Marcador de peso molecular pUC Mix, 2) HEK-293T sin ADN transfectado, 3) HEK-293T con pReceiver y 4) HEK-293T con pABER α .

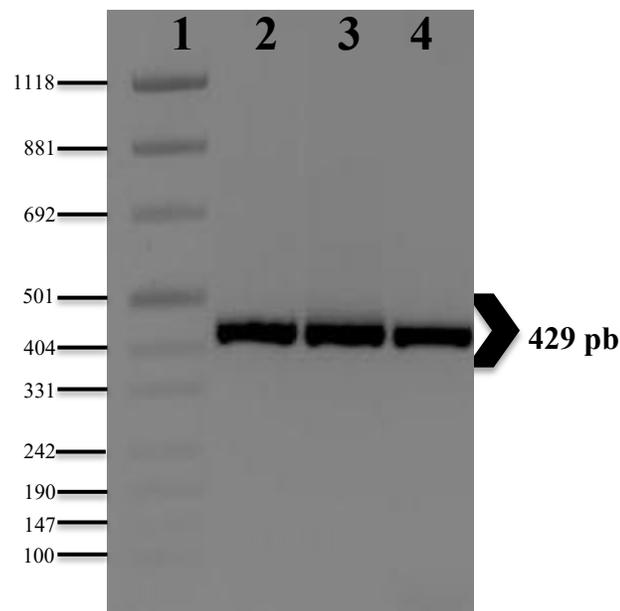


Fig. 45. Análisis electroforético de la RT-PCR de GAPDH. RT-PCR de GAPDH evaluada en las diferentes condiciones: 1) Marcador de peso molecular pUC Mix, 2) HEK-293 sin ADN, 3) HEK-293T con pReceiver, y 4) HEK-293T con pABER α .

9. DISCUSIÓN:

ANTECEDENTES DE METILACIÓN Y REPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL LOCUS DEL ER α .

La regulación epigenética es un mecanismo importante por el cual las células modulan la expresión génica. La metilación del ADN como mecanismo de regulación epigenético ha sido bien documentada, un claro ejemplo, es la falta de expresión del ER α en pacientes diagnosticados con la forma triple negativa (HER-2-, PR β - y ER α -) de cáncer de mama ya que la pérdida de expresión del ER α está asociada a un incremento en la metilación de regiones ricas en dinucleótidos CpGs, presentes en los promotores A y B del ER α (Weigel y deConinck., 1993). Sin embargo, se desconoce si en todos los tipos de cáncer de mama que no expresan ER α se presenta el mismo patrón de metilación o si existen diferencias en otros componentes proteicos de la cromatina.

Diversos estudios han demostrado que la metilación de la región promotora del gen codificante del ER α no es el único mecanismo para la inactivación de la expresión, ya que el silenciamiento de metilación también involucra la asistencia de desacetilasas de histonas (HDACs) (Nakao., 2001). No obstante, en los últimos años se han incrementado las evidencias sobre otros posibles eventos que podrían preceder al proceso de metilación y desacetilación, incluyendo la pérdida de activadores transcripcionales o la presencia de factores que inhiben o activan a las enzimas involucradas en la compactación de la cromatina, que también resultaría en el silenciamiento de genes como el que codifica para ER α (Chen et. al., 1998). La posible existencia de estas diferencias proteicas podría servir para identificar subgrupos de pacientes clasificados como ER α negativos.

HERRAMIENTAS MOLECULARES ASOCIADAS AL ESTUDIO DEL REVESTIMIENTO PROTEICO DEL RECEPTOR DE ESTROGENOS ALFA (ER α)

La diferencia entre la presencia y ausencia de factores o proteínas involucradas en el silenciamiento del gen codificante del ER α podría funcionar como firma biológica para la separación de grupos de pacientes clasificados en forma general como triples negativos.

Sin embargo, en la actualidad, las técnicas utilizadas para el estudio en la variación del revestimiento proteico de la cromatina, se limitan a técnicas como la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y sus variantes. Estas metodologías brindan un panorama general, además requieren obligatoriamente del conocimiento previo de al menos uno de los elementos reguladores asociados a la cromatina en el locus de interés. Actualmente ninguna de las variantes de ChIP facilita un análisis comparativo de la composición proteica de la cromatina de un locus específico como el del ER α . Diversos grupos de investigación han concluido que dicha problemática requiere del desarrollo de nuevas herramientas (Berdasco y Esteller., 2010).

En esta tesis se propone un sistema que permita identificar diferencias en el revestimiento proteico de la cromatina que pudieran asociarse a la respuesta clínica que presentan las pacientes triples negativas. En una segunda etapa podría investigarse si estos cambios en el revestimiento proteico de la cromatina afecta el nivel de organización y la eficiencia transcripcional del locus del ER α .

DISEÑO DE UN SISTEMA PRESA-ANZUELO PARA EL ESTUDIO EPIGENÉTICO.

El presente trabajo se enfocó en la generación de un nuevo sistema tipo presa-anzuelo, que permita estudiar el revestimiento proteico de regiones específicas de la cromatina. Nuestro planteamiento se basa en el reconocimiento de un locus específico a través de una proteína capaz de reconocer una secuencia única en el genoma humano, específicamente, elegimos una secuencia exógena al genoma humano, como lo son los elementos de respuesta al factor de transcripción de levaduras Gal4 (UAS_{Gal4}). Las células transfectadas con el ADN recombinante del locus humano y UAS_{Gal4} requeriría de la expresión transgénica de Gal4 o sólo de su dominio de unión a ADN (DBD_{Gal4}).

Con el objetivo de simplificar este sistema, se clonó los loci de interés (promotores A y B de ER α) dentro de un vector carente de promotores (pGL3Basic) para evaluar la actividad de los promotores mediante la expresión de la luciferasa. A este plásmido se le insertarían 5 repeticiones en tándem de UAS_{Gal4} para asegurar la unión con DBD_{Gal4}. Por otro lado, se realizaría una construcción para DBD_{Gal4} en un sistema de expresión, basado

en la inserción de su ADNc en el vector de expresión pcDNA3.1/NT-GFP. Ambas construcciones serían transfectadas en una línea celular que no expresara el ER α . Una vez transfectadas se esperaría que la proteína recombinante GFP-DBD se uniera a los UAS_{Gal4} contenidos dentro del plásmido presa.

El complejo de GFP-DBD_{Gal4}+UAS_{Gal4}-pGL3-pABER α (descrito en materiales y métodos) se recuperaría de un lisado celular mediante la técnica de *pull down* con un anticuerpo anti-GF. La presencia de este complejo en el material precipitado se comprobaría a través de la amplificación del gen reportero luciferasa.

Una de las limitantes en la realización de éste procedimiento experimental es que se carece del conocimiento acerca de la capacidad que tiene el ADN transfectado transitoriamente para formar una estructura de cromatina. A menudo se asume que el ADN plasmídico transfectado transitoriamente permanece como cromatina libre, sin embargo, nueva evidencia ha sido obtenida, en donde se observa que el ADN plasmídico se asocia con histonas poco después de ser liberado en el núcleo y forma una estructura nucleosomal estequiometricamente similar a un fragmento de ADN cromosomal. Además se ha demostrado que las modificaciones postraduccionales sobre las histonas del nucleosoma están presentes en el plásmido, estas modificaciones podrían regular los genes plasmídicos (Khobta., *et. al.* 2010).

OBTENCIÓN Y VALORACIÓN FUNCIONAL DEL PLÁSMIDO “PRESA”.

Para la generación del plásmido pGL3-pABER α , se obtuvo el amplicón de los promotores A y B del ER α con un tamaño aproximado de 650 pb, el cual se insertó en el vector pCR2.1 TOPO mediante el sistema de clonación TA. Este tipo de sistema facilita la ligación de cualquier inserto obtenido por PCR, ya que las reacciones de PCR adicionan residuos de adeninas en uno de los extremos del amplicón, facilitando así su ligación al vector de clonación, que se encuentra de forma lineal con residuos de timina en el sitio de clonación. El apareamiento T-A favorece una ligación exitosa entre el inserto y el vector. Se decidió insertar inicialmente la secuencia de los promotores A y B del ER α dentro del vector pCR2.1 TOPO para obtener los sitios de restricción *Kpn* I y *Xho* I que favorecieron

la subclonación en el vector pGL3Basic que contiene estos sitios de restricción en su sitio de multiclonación.

Por otro lado, la expresión del gen reportero luciferasa presente en el plásmido pGL3-pABER α indica que el plásmido presa después de ser transfectado en la línea celular HEK-293T cambia su conformación a un estado cromatinizado, ya que una molécula de ADN desnuda no puede simplemente expresarse, esto debido a que requiere de la unión de diversos factores de inicio de la transcripción así como toda la maquinaria transcripcional. La unión de esta diversidad proteica genera cambios estructurales sobre la molécula de ADN causando las modificaciones necesarias para el reconocimiento específico de las proteínas asociadas a la expresión génica. La cromatinización del plásmido es esencial para el objetivo del proyecto, ya que se podrían analizar diversas proteínas unidas a la molécula de ADN que participan directa o indirectamente en la inhibición o expresión del gen reportero luciferasa, lo cual también depende del ambiente celular en donde se realice la transfección del plásmido pGL3-pABER α .

Los cambios en la morfología celular por la transfección no fueron evidentes hasta 24 horas después del procedimiento (Fig. 42), mostrando retracción y agregados celulares, sin embargo, el control de transfección con el plásmido pReceiver mostró mayor daño celular. No obstante, tampoco se descarta que el daño ocurriera simplemente por el tratamiento con el fosfato de calcio, aunque en ambas transfecciones se utilizó la misma concentración de fosfato de calcio (2mM) según lo recomendado por el proveedor, sin embargo se ha reportado que este tipo de cambios sobre la estructura celular son inherentes a la naturaleza de los métodos químicos de la transfección y dependiendo de su naturaleza química puede observarse o no pérdida celular, menor o mayor toxicidad celular así como efectos mínimos no deseados que son importantes para la interpretación de resultados. Cabe destacar que cada tipo celular responde de diferente manera al tratamiento de transfección por lo que el grado de variación morfológica depende de las células (Mirus Bio LLC., 2012). Los efectos citotóxicos observados en las células transfectadas con el plásmido pReceiver indican que un exceso en la concentración del plásmido podría también contribuir a la toxicidad celular.

Para constatar que la transfección del plásmido pGL3-pABER α ocurrió exitosamente, se realizó una RT-PCR del gen reportero de la luciferasa, resultando en la obtención del amplicón esperado con un tamaño de 1.6 Kb, sin embargo, se observa una banda tenue (Fig. 44) lo que indicaría que la eficiencia de transfección fue baja debido probablemente a que la transfección se realizó cuando el cultivo celular no se encontraba en la confluencia adecuada (60 – 80% para células adherentes) o las células no se encontraban en división celular, ya que se ha reportado que altos niveles de transfección son obtenidos cuando las células se encuentran en división, esto es de gran importancia en transfecciones de plásmidos ya que la envoltura nuclear se encuentra inestable durante la división celular favoreciendo la introducción de ácidos nucleicos (Mirus Bio LLC., 2012). De igual modo, cabría la posibilidad de que la selección del método químico para la transfección no fue el adecuado, repercutiendo esto, en una baja producción de transcrito o bien, pudiera ser que las condiciones de amplificación no hayan sido las óptimas para la amplificación del ADNc del gen reportero, requiriéndose más ciclos o tal vez la modificación de la temperatura en ciertos pasos que hiciera más eficiente la amplificación, no obstante, la modificación de temperatura podría ocasionar la amplificación inespecífica de fragmentos no deseados.

La comprobación de la expresión de luciferasa a través de los promotores A y B del receptor de estrógenos alfa (ER α) podría servir como referencia para ensayos en donde se evaluará la represión transcripcional de estos promotores, que se refleja como cambios en el revestimiento proteico de la cromatina.

OBTENCIÓN Y VALORACIÓN FUNCIONAL DEL SISTEMA DE EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA “ANZUELO” (GFP-DBD_{Gal4}).

Para la generación del plásmido que expresaría la proteína recombinante GFP-DBD_{Gal4}, inicialmente se realizaron ensayos de restricción con las enzimas *Kpn* I y *Eco* RV sobre el sitio de multiclonación del plásmido pcDNA3.1/NT-GFP TOPO donado por el laboratorio de Bioquímica del Dr. Luis Felipe Montaña Estrada, perteneciente a la Facultad de Medicina de la UNAM. Se eligió este sistema de expresión debido a que está diseñado para la expresión constitutiva y en altos niveles (por la presencia del promotor CMV) de proteínas fusionadas a GFP. Se eligió trabajar con un sistema de expresión de la proteína

GFP debido a que GFP es estable y no requiere de sustratos y cofactores (Liu., *et al.* 1999), además mantiene la fluorescencia aun cuando se fusiona a otra proteína tanto en el extremo amino y/o carboxilo terminal, lo cual le confiere una capacidad óptima como etiqueta fluorescente para monitorear actividades subcelulares, expresión génica, interacción proteína-proteína, tráfico y localización *in vivo* (Koike., *et al.* 2013).

La inserción inicial del DBD_{Gal4} en el plásmido mencionado, brindó resultados preliminares positivos para la amplificación DBD_{Gal4} a partir del ADNc obtenido de las células transfectadas con el plásmido generado (pcDNA3.1/NT-GFP-DBD). Sin embargo, no se obtuvo lectura de fluorescencia en la citometría de flujo de las células transfectadas con pcDNA3.1/NT-GFP-DBD. Para corroborar los datos obtenidos por citometría, las células se analizaron por microscopia de fluorescencia obteniéndose el mismo resultado (fluorescencia nula). Para asegurarse que la falta de fluorescencia no fuera un falso negativo, se realizaron ensayos de *Western-blot* de extractos proteicos de las transfectantes, los cuales resultaron negativos a la expresión de DBD, dichos resultados no se muestran en la tesis. De estos resultados se concluyó que el transcrito del DBD sí era producido por la maquinaria transcripcional de la célula hospedero, sin embargo, no se obtuvo la proteína recombinante esperada debido a que el plásmido donado era en realidad el plásmido de control del sistema de clonación pcDNA3.1/NT-GFP. Aunada a la correcta identificación del plásmido, los análisis realizados mostraron que el sitio en donde se realizó la inserción de DBD_{Gal4} (sitios de reconocimiento para *Kpn* I y *Eco* RV) correspondía a una región esencial para la expresión de GFP, por lo que el corte con las enzimas *Kpn* I y *Eco* RV ocasionó la pérdida de dicha región, repercutiendo en la emisión fluorescencia y en la generación adecuada de la proteína recombinante. Esto representaba un serio problema para el objetivo de este proyecto, ya que al no generarse la proteína recombinante que expresara la etiqueta GFP se reduciría la probabilidad de recuperación por *pull down* de dicha proteína. Para resolver este problema se decidió mandar la secuencia y amplicón de DBD_{Gal4} a una empresa especializada en procesos experimentales de biología molecular.

El DNA plasmídico de pGBKT7 que contiene la secuencia de DBD_{Gal4} así como el amplicón de 555 pb correspondiente a DBD_{Gal4} se deshidrataron para enviarse a la

compañía *Science Exchange-ProNovus Bioscienc, LLC* (Mountain, CA, EUA), experta en biología molecular, debido a que ellos cuentan con el sistema de clonación pcDNA3.1/NT-GFP. Una vez obtenida la inserción de DBD_{Gal4} (pcDNA3.1-GFP-DBD) en el sistema de clonación antes mencionado, se solicitó que a dicho plásmido se le adicionara una etiqueta de histidinas (6xHis) para facilitar la recuperación de la proteína recombinante en futuros ensayos mediante columnas de níquel. La adición de histidinas a pcDNA3.1-GFP-DBD generó al plásmido pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD.

Ambos plásmidos (pcDNA3.1-GFP-DBD y pcDNA3.1-6xHis-GFP-DBD) fueron analizados por PCR, análisis de restricción y secuenciación para comprobar que el inserto en los plásmidos correspondiera a la secuencia de DBD_{Gal4} (Figs. 28-32). Una vez comprobada la identidad de los plásmidos, se transfectaron de forma independiente en la línea celular HEK-293T. La expresión de la proteína recombinante (GFP-DBD_{Gal4}) fue evaluada por microscopia de fluorescencia, citometría de flujo y *Western-blot* (Figs. 35-37; 40-41) en las cuales se obtuvieron resultados positivos. No obstante, cuando se evaluó la presencia del transcrito de la proteína recombinante mediante RT-PCR ésta resultó negativa al amplicón de 555 pb correspondiente a DBD_{Gal4} (Fig. 39). La baja expresión observada tanto en microscopia como en la detectada en citometría (Figs. 35-37) se debió probablemente a que los genes transfectados transitoriamente solo son expresados por un periodo limitado y no se integran en el genoma y la expresión se puede perder por factores ambientales y la división celular.

De igual modo, se optó por la transfección transitoria del sistema de expresión de GFP debido a que varios estudios han reportado que existe una baja eficiencia en la producción de líneas celulares estables que produzcan GFP (Koike., *et al.* 2013). Además se ha comprobado que la dificultad para obtener células con una expresión de GFP constante se atribuye a los periodos largos de excitación de GFP que pueden generar radicales libres los cuales son genotóxicos para la célula. Asimismo se ha observado que los niveles de expresión de GFP aunque sean mínimos inducen apoptosis estimulando una vía de señalización similar a la desencadenada por la infección del virus del dengue (Liu., *et al.* 1999; Koike., *et al.* 2013).

Por otro lado, aunque se observó la presencia de la proteína recombinante de forma significativa en el ensayo de *Western-blot* (Figs. 40-41), los resultados mostraron que el brillo de GFP no se correlaciona con los niveles de expresión de GFP, esto debido a que la fluorescencia de GFP es determinada principalmente por la emisión y la excitación de la longitud de onda de GFP. Asimismo se ha demostrado que las longitudes de onda varían de acuerdo a la modificación del gen de GFP respecto a la GFP silvestre (Liu., *et al.* 1999).

La expresión localizada de la proteína recombinante DBD-GFP (Figs. 35 y 36) se atribuía a que la proteína se posicionaba en espacios subcelulares específicos debido a la secuencia de aminoácidos que contenía. Sin embargo, diversos estudios han demostrado que este tipo de expresión se debe a que ciertas fusiones con GFP pueden generar proteínas recombinantes inestables que tienden a formar agregados perinucleares, los cuales resultan ser tóxicos para las células. Asimismo, se ha observado que la adición de un péptido en la región C-terminal de GFP promueve el desplegamiento o multidimerización resultando en una proteína que es propensa a agregación y sujeta a degradación proteosomal mediada por chaperona en la línea celular HEK-293T (Link., *et al.* 2006).

La diferencia de expresión y de distribución entre la proteína recombinante DBD-GFP y los controles pReceiver y pcDNA3.1/NT-GFP podría deberse a que la adición de residuos en el C-terminal de GFP puede convertir la proteína soluble en un agregado. Esta observación es un contraste rígido para muchos ejemplos donde las proteínas de fusión permanecen solubles o asumen la distribución celular de la proteína de fusión a la que se unió GFP. Lo que sugiere que la fusión de proteínas conduce a una única característica estructural dependiente de la composición aminoacídica que le da propiedades bioquímicas de solubilidad. La fusión podría resultar en una interferencia con el plegamiento de GFP favoreciendo a la predisposición de formación de agregados fluorescentes.

Se ha reportado que colonias de células que expresan transitoriamente la proteína amarilla fluorescente (YFP) y la proteína fluorescente cian (ECFP) pueden propagarse a la obtención de clonas estables (Koike., *et al.* 2013), estos datos se podrían considerar para futuros ensayos donde se tenga como objetivo la expresión constitutiva de un etiqueta

fluorescente. Además se ha visto que la citotoxicidad de YFP es más baja que la inducida por GFP, lo que sugiere que la selección de la proteína debe ser de gran importancia para prevenir efectos adversos sobre las células.

Las incongruencias entre la expresión de la proteína GFP-DBD_{Gal4} y la falta de amplificación de su transcrito (Fig. 39 A) puede tener diferentes explicaciones: 1) vida media corta del transcrito, 2) dificultad en la generación del ADNc del transcrito y 3) dificultad del reconocimiento eficiente del transcrito para su amplificación.

Cabe destacar que a pesar de obtener un acercamiento mediante las diversas técnicas desarrolladas *in vitro* a los procesos genéticos-moleculares que regulan la expresión génica dentro de un ambiente celular, hay que tomar en cuenta que el reclutamiento de las proteínas reguladoras puede ser diverso, ya que se pueden unir directamente a un sitio consenso o no consenso a través de un dominio de unión, o bien, unirse de forma indirecta en donde no necesita de un dominio de unión pero sí podría requerir de una interacción adicional proteína-proteína o asas de ADN podrían ser demandadas tanto para una proteína con un dominio de unión a ADN o para una interacción entre los dominios de proteína-proteína.

10. CONCLUSIONES

- ❑ Se obtuvo la construcción parcial del plásmido “presa” pGL3-pABER α , ya que aún carece de los elementos de respuesta a Gal4 (UAS_{Gal4}), esenciales para contar con la totalidad del sistema planteado en este proyecto.
- ❑ Se obtuvo el sistema de expresión de la proteína recombinante DBD-GFP “anzuelo” que demostró ser eficiente, ya que produce los niveles de proteína suficientes para su detección por microscopia de fluorescencia, citofluorometría y *Western blot*.

11. PERSPECTIVAS

- Completar la construcción del plásmido “presa” con la inserción de las 5 repeticiones en tándem de los elementos de respuesta a Gal4 (UAS_{Gal4}) en el sitio de corte de la enzima de restricción *Not I* ubicado en la región 5’ de los promotores A y B del ER α .
- Cotransfectar ambos plásmidos (pGL3-pABER α + UAS_{Gal4} y pcDNA3.1-GFP-DBD) en líneas celulares humanas
- Recuperar el complejo DBD_{Gal4}-pGL3-pABER α de un lisado celular de las transfectantes mediante un ensayo de *pull down* con un anticuerpo anti-GFP o a través de una columna de níquel.
- Identificar las proteínas que se asocian al ADN plasmídico recuperado en el *pull down* a través de espectrometría de masas.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Berdasco, M and Esteller M.** 2010. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell.* **19(5):**698-711.
- Bernstein, B. E., Meissner A and Lander E. S.** 2007. The mammalian epigenome. *Cell* **128:**669–681.
- Bland, K. I and Edward M.** 2007. LA MAMA. 3era edición. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana S.A. p. 400-425.
- Castles, C. G., Oesterreich S., Hansen R., Fuqua S. A. W.** 1997. Auto-regulation of the estrogen receptor promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol* **62:**155–163.
- Chen, Z., Ko, A., Yang, J and Jordan, V. C..** 1998. Methylation of CpG island is not a ubiquitous mechanism for the loss of oestrogen receptor in breast cancer cells. *Br. J. Cancer* **77:**181–185.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.** 1987. *Anal Biochem.* **162:** 156-159.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., and Miller, R. H.** 1989. One-Step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA.** **86:**2172-2175
- Clark, G. M., Osborne C. K and McGuire W. L.** 1984. Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor, and patient characteristics in human breast cancer. *J Clin Oncol* **2:**1102–1109.
- Curado, M. P.** 2011. Breast cancer in the world: incidence and mortality. *Salud pública de Mexico.* **53(5):** 372-84.
- deConinck, E. C., McPherson L. A and Weigel R. J.** 1995. Transcriptional regulation of estrogen receptor in breast carcinomas. *Mol Cell Biol* **15:**2191–2196.
- Esteva, F. J and Hortobagyi, G. N.** 2004. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res* **6:** 109-118.
- Fan, M., Yan, P. S., Hartman-Frey, C., Chen, L., Paik, H., Oyer, S. L., Salisbury, J. D., Cheng, A. S., Li, L., Abbosh, P. H., Huang, T. H and Nephew, K. P.** 2006. Diverse gene expression and DNA methylation profiles correlate with differential adaptation of breast cancer cells to the antiestrogens tamoxifen and fulvestrant. *Cancer Res.* **66:**11954–11966.
- Ferguson, A. T., Lapidus, R. G., Baylin, S. B and Davidson, N. E.** 1995. Demethylation of the estrogen receptor gene in estrogen receptor-negative breast cancer cells can reactivate estrogen receptor gene expression. *Cancer Res.* **55:**2279–2283.
- Gade, P and Kalvakolanu, D. V.** 2012. Chromatin Immunoprecipitation as a Tool for Analyzing Transcription Factor Activity. *Methods Mol Biol.* **809:**85-104.

- Gong, J., Traganos, F and Darzynkiewicz, Z.** 1994. A selective procedure for DNA extraction from apoptosis cell applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal biochem.* **218(2)**:314-319
- Gosden, J. R., Middleton, P. G and Rout, D.** 1986. Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24–q27 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **43**:218–220.
- Grandien, K., Backdahl, M., Ljunggren, O., Gustafsson, J. A and Berkenstam, A.** 1995 Estrogen target tissue determines alternative promoter utilization of the human estrogen receptor gene in osteoblasts and tumor cell lines. *Endocrinology.* **136**:2223–2229.
- Hanahan, D and Weinberg, R. A.** 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**:57-70.
- Hanahan, D and Weinberg, R. A.** 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* **144(5)**: 646–674.
- Hayashi, S. I., Eguchi, H., Tanimoto, K., et al.** 2003. The expression and function of estrogen receptor alpha and beta in human breast cancer and its clinical application. *Endocr Relat Cancer*.**10**:193–202.
- Heyn, H and Esteller, M.** 2012. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet.* **13**:679–692.
- International Human Genome Sequencing Consortium.** 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* **431**:931–945.
- Jordan, V. C and O'Malley, B. W.** 2007. Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer. *J Clin Oncol.* **25**:5815–5824.
- Kerdivel, G., Flouriot, G and Pakdel, F.** 2013. Modulation of Estrogen Receptor Alpha Activity and Expression During Breast Cancer Progression. *Vitamins and Hormones.* **93**:135-160.
- Khobta, A. et al.** 2010. Gene silencing induced by oxidative DNA base damage; association with local decrease of histone H4 acetylation in the promoter region. *Nucleic Acids Research.* **38(13)**: 4285-4295.
- Khodthong, C. et al.** 2012. The impact of transfection Mediated Toxicity-Gene Expression and Cytotoxicity Analysis of Transfection Reagents. **Mirus Bio LLC**, www.mirusbio.com.
- Klinge, C. M.** 2001. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Research* **29**:2905–2919.
- Koike, M. et al.** 2013. Ku80 attenuates cytotoxicity induced by Green fluorescent protein transfection independently of non-homologous end joining. *FEBS open Bio.* **3**: 46-50.
- Konduri, S. D and Medisetty, R.** 2010. Mechanisms of estrogen receptor antagonism toward p53 and its implications in breast cancer therapeutic response and stem cell regulation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **107(34)**:15081-15086.

Kos, M., Reid, G., Denger, S., and Gannon, F. 2001. Genomic organization of the human ER gene promoter region. *Mol. Endocrinol.* 15:2057–2063.

Lavrrar, J. L and Farnham, P. 2004. The use of transient Chromatin Immunoprecipitation Assays to Test Models for E2F1-specific Transcriptional Activation. *The Journal of Biological Chemistry.* 279(44):46343-46349.

Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, Xi., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y and Pietenpol J. A. 2011. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 121(7): 2750-2767.

Link, C. D. et al. 2006. Conversion of Green Fluorescent Protein into a Toxic, Aggregation-prone Protein by C-terminal Addition of a Short Peptide. *Journal of Biological Chemistry.* 281(3):1800-1817.

Liu, H. S. et al. 1999. Is Green Fluorescent Protein Toxic to the Living Cells. *BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS.* 260(3):712-717.

Maston, G. A., Evans, S. K., Green, M. R. 2006. Transcriptional Regulatory Elements in the Human Genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet.*

Nakao, M. 2001. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene.* 278:25–31.

Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., et. al. 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev.* 81(4):1535-1565.

Osborne, C. K., Schiff, R., Fuqua, S. A and Shou, J. 2001 Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation. *Clinical Cancer Research.* 7:4338s–4342s; discussion 4411s–4412s.

Parker, J. S., Mullins, M., Cheang, M. C., et al. 2009. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol.* 27:1160-1167.

Penolazzi, L., Lambertini, E., Aguiari, G., del Senno, L and Piva, R. 2000. Cis element “decoy” against the upstream promoter of the human estrogen receptor gene. *Biochim Biophys Acta* 14 92:560–567.

Ponglikitmongkol, M., Green, S and Chambon, P. 1988. Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. *EMBO J.* 7:3385–3388.

Ren, B., et al. 2009. Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science* 290:2306–2309.

Schuur, E. R., McPherson, L. A., Yang, G. P and Weigel, R. J. 2001. Genomic structure of the promoters of the human estrogen receptor- α gene demonstrate changes in chromatin structure induced by AP2 γ . *J Biol Chem.* 276:15519–15526.

Seal, M. D and Chia, S. K. 2010. What is the difference between triplenegative and basal breast cancers? *Cancer J.* 16:12-16.

Sorlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., *et al.* 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. **98**:10869-10874.

Talman, M. L., Rasmussen, B. B., Andersen, J and Christensen, I. J. 2008. Estrogen receptor analyses in the Danish Breast Cancer Cooperative Group. History, methods, prognosis and clinical implications. *Acta Oncol*. **47**:789–794.

The ENCODE Project Consortium. 2007. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot Project. *Nature*. **447(7146)**: 799–816

The ENCODE Project Consortium. 2012. An Integrated Encyclopedia of DNA Elements in the Human Genome. *Nature*. **489(7414)**: 57–74.

van Agthoven, T., van Agthoven, T. L., Dekker, A., Foekens, J. A and Dorsers, L. C. 1994. Induction of estrogen independence of ZR-75-1 human breast cancer cells by epigenetic alterations. *Mol Endocrinol*. **8**:1474–1483.

Walter, P., Green, S., Greene, G., Krust, A., Bornert, J. M., Jeltsch, J. M., Staub, A., Jensen, E., Scrace, G and Waterfield, M. 1985. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. **82**:7889–7893.

Weigel, R. J and deConinck E. C. 1993. Transcriptional control of estrogen receptor in estrogen receptor-negative breast carcinoma. *Cancer Res*. **53:3** 472–3474.

Weigel, R. J., Crooks, D. L., Iglehart, J. D and deConinck, E. C. 1995. Quantitative analysis of the transcriptional start sites of estrogen receptor in breast carcinoma. *Cell Growth Differ*. **6**:707–711.

Yang, X., Ferguson, A. T., Nass, S. J., Phillips, D. L., Butash, K. A., Wang, S. M., Herman, J. G and Davidson, N. E. 2000. Transcriptional activation of estrogen receptor α in human breast cancer cells by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res*. **60**:6890–6894.

Yang, X., Phillips, D. L., Ferguson, A. T., Nelson, W. G., Herman, J. G and Davidson, N. E. 2001. Synergistic activation of functional estrogen receptor (ER)- α by DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in human ER- α -negative breast cancer cells. *Cancer Res*. **61**:7025–7029

Wells, J and Farnham, P. 2002. Characterizing transcription factor binding sites using formaldehyde crosslinking and immunoprecipitation. *Methods*. **26**: 48-56