



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EL PAPEL DE YY1 EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL
DE *XAF1***

TESIS

**Que para obtener el título de:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**Presenta:
BERENICE CAMACHO MOCTEZUMA**

Director de Tesis: Dr. Ulises Martínez Ruiz

CIUDAD UNIVERSITARIA

C.D MX.

2018





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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARISOL LÓPEZ LÓPEZ

VOCAL: MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO

SECRETARIO: GUSTAVO ULISES MARTÍNEZ RUIZ

1er. SUPLENTE: FRANCISCA MORAYNA GUTIÉRREZ LUNA

2° SUPLENTE: SARA MARGARITA GARZA AGUILAR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN PATOLOGÍA EXPERIMENTAL,
HOSPITAL INFANTIL FEDERICO GÓMEZ .**

FIRMA

ASESOR DEL TEMA:

Gustavo Ulises Martínez Ruiz

SUSTENTANTE (S):

Berenice Camacho Moctezuma

Agradecimiento especial

“Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM
<<Clave y número de proyecto: IA210117 >>.
“Agradezco a la DGAPA-UNAM por la beca recibida”

Abreviaturas

APE	Antígeno prostático específico
BIR	<i>Baculovirus IAP Repeat</i>
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas
CSIM	Complejo de Señalización Inductor de Muerte
Cyt-c	Citocromo C
DED	Dominio efector de muerte
DNMT	DNA Metil Transferasa
DR5	Receptor de muerte 5
FADD	Dominio de muerte asociado a Fas
FasL	Ligando de Fas
HSF1	Factor de Choque térmico 1
IRES	Elemento de respuesta estimulado por interferón
ISG	Genes estimulados con interferón
PIAs	Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis
PMEM	Permeabilidad de la Membrana Externa de la Mitocondria
RA	Receptor de andrógenos
SIT	Sitio de inicio de la transcripción
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPA	Terapia de privación de andrógenos
TRADD	Dominio de muerte asociado a TNF
TRAIL	Ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF

ÍNDICE

Introducción.....	1
Marco teórico.....	3
1. Cáncer	3
2. Apoptosis	3
2.1 Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis	5
2.2 Antagonistas de las Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis.....	6
3. XAF1.....	8
3.1 Relación entre XAF1 y cáncer.....	9
3.2 La pérdida de heterocigosis no está asociada al silenciamiento de <i>XAF1</i> . 10	
3.3 Hipermetilación en la secuencia promotora de <i>XAF1</i>	11
3.4 Mecanismos transcripcionales asociados a la regulación de <i>XAF1</i>	12
3.4.1 Regulación positiva de la expresión de XAF1	12
3.4.2 Regulación negativa de la expresión de <i>XAF1</i>	13
4. YY1 como regulador transcripcional	14
5. Cáncer de próstata como modelo de estudio.....	15
6. Antecedentes inmediatos al tema de investigación	17
6.1 Hipótesis	19
6.2 Objetivo general.....	19
6.3 Objetivos particulares	19
7. Metodología	20
Resultados	30
Discusión.....	38
Conclusiones.....	42
Anexo.....	43
Referencias bibliográficas	44

Introducción

El término cáncer engloba a un conjunto de enfermedades que se caracterizan por un proceso de crecimiento acelerado y, en muchos de los casos, por la diseminación incontrolada de las células que lleva a la formación de tumores secundarios [1]. Existen diferentes características que presentan las células tumorales, una de ellas es la resistencia a la muerte celular programada [2].

La apoptosis o muerte celular programada es fundamental para mantener la homeostasis de tejidos, ya que participa en la remoción de células dañadas asegurando la salud del organismo en cuestión [3]. El mecanismo de apoptosis está relacionado con la activación de enzimas proteolíticas llamadas caspasas, las cuales tienen actividad cisteín-proteasa y son activadas mediante estímulos apoptóticos [4]. La función de las caspasas consiste en la degradación de diversos componentes celulares alterando así las vías de señalización celular necesarias para la viabilidad celular, generando las características apoptóticas tanto bioquímicas como morfológicas [5]. La regulación de la apoptosis ha sido asociada a diferentes mecanismos, sin embargo, uno de los más descritos se da por la inhibición de las caspasas, el cual es mediado por proteínas conocidas como PIAs (Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis) [6]. Las PIAs son una clase de proteínas caracterizadas por la presencia de al menos un dominio *Baculovirus IAP Repeat* (BIR) y otros dominios funcionales, son altamente conservadas y el miembro más estudiado es XIAP (*X-linked IAP*) [7]. A través de los dominios BIRs las PIAs regulan negativamente a las caspasas y de esta forma reprimen la culminación de la apoptosis [6]. La desregulación de este mecanismo se ha visto implicado en diferentes patologías, tal es el caso del cáncer. Se ha reportado que para diversos tipos de cáncer la sobreexpresión de las PIAs promueve una resistencia a la muerte celular debido a la inhibición de las caspasas [8].

Existen reguladores endógenos con actividad antagonista para las PIAs cuya presencia induce la liberación de las caspasas previamente inhibidas por las PIAs reactivándose así la apoptosis [8]. Entre esos antagonistas se encuentra *XIAP-associated factor 1* conocido como **XAF1** [9]. XAF1 fue identificado inicialmente como una proteína de unión a XIAP capaz de inhibir su actividad anti-caspasa [9]. Sin embargo, en la última década su estudio ha tomado gran relevancia. Al contrario, a XIAP, la expresión de *XAF1* en muchos tipos de cáncer es nula o disminuida y junto con otros aspectos que se abordarán adelante en la presente tesis; *XAF1* es considerado como un **gen supresor de tumor**. La ausencia o baja expresión de *XAF1* en muchos tipos de cáncer es parcialmente explicado por la presencia de marcas epigenéticas represivas como la metilación [10] y a mecanismos represores de la transcripción aún no esclarecidos. En este sentido, **YY1** (Yin Yang 1) es un factor de transcripción que puede funcionar como activador o represor de la transcripción, siendo este último explicado por su asociación con proteínas relacionadas con la metilación [11]. De forma importante, YY1 es un factor involucrado en carcinogénesis debido al programa transcripcional que modula [12].

El presente trabajo muestra que, YY1 es capaz de inhibir la expresión transcripcional de *XAF1* a través de su interacción con la secuencia promotora de este último en un modelo de cáncer de próstata. En este tipo de cáncer la expresión de *YY1* ha sido asociada con la malignidad de la enfermedad [13] y una baja expresión de *XAF1* correlaciona con peores escenarios clínicos [14, 15]. Siendo así, el papel oncogénico de YY1 pudiera ser explicado mediante el silenciamiento de genes supresores de tumor como lo realiza con *XAF1*.

Marco teórico

1. Cáncer

Cáncer es un término muy amplio que abarca a más de 200 enfermedades distintas, todas ellas convergen en un evento común: crecimiento celular incontrolado y el potencial de desarrollar metástasis [1].

El cáncer es considerado como una de las principales causas de muerte en todo el mundo [1]. En los últimos años, estudios han demostrado que este padecimiento es consecuencia de las alteraciones tanto estructurales en el ADN como epigenéticas [1, 10]. Estas mutaciones proporcionan una célula con atributos que le permiten eludir los mecanismos reguladores que controlan el crecimiento y proliferación celular normal. Estos atributos denominados ***The hallmarks of cancer***, explican por la presencia de capacidades biológicas adquiridas como es que un grupo de células pueden proliferar anormalmente y desarrollar un potencial de crecimiento en lugares distantes del tumor, e incluyen: el mantenimiento de la señalización proliferativa, evasión a supresores de crecimiento, **resistencia a la muerte celular**, inmortalidad replicativa, angiogénesis y finalmente un proceso de invasión y metástasis [2].

2. Apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que tiene implicaciones en el cáncer pues este se ha visto atenuado en células tumorales fomentando su progresión a estados de malignidad de alto grado [5]. De forma normal, la muerte celular por apoptosis juega un papel fundamental en la regulación de la homeostasis tisular, el desarrollo de órganos y la eliminación de células defectuosas en un organismo complejo [14]. Este mecanismo se encuentra relacionado con la activación de enzimas cisteín proteasas denominadas **caspasas**.

Basadas en su función, existen caspasas apoptóticas (2,3, 7,8, 9 y 10) y caspasas implicadas en la inflamación (1,4,5, 11 y 12) [5]. Las primeras se subdividen en dos grupos: caspasas iniciadoras (caspasas 2,8,9 y 10) y caspasas efectoras (3,6 y 7), tal clasificación comprende la presencia o ausencia de dominios de interacción con

proteínas específicas[5]. Las caspasas iniciadoras están implicadas en la transducción de los inductores proapoptóticos mientras que las efectoras poseen funciones proteolíticas sobre diferentes componentes celulares [5].

Las caspasas se caracterizan por cortar a las proteínas en residuos de ácido aspártico; se sintetizan como zimógenos inactivos (procaspasas) y están constituidas por un prodominio N-terminal y por dos subunidades denominadas p20 y p10 [16]. Las caspasas iniciadoras poseen un prodominio mayor que las caspasas efectoras, debido a que contienen dominios de reclutamiento y activación de caspasas denominados dominios CARD y/o dominios efectores de muerte DED [5]. DED y CARD pertenecen a la familia de los dominios de muerte. Estos dominios median las interacciones proteína-proteína entre las procaspasas y sus adaptadores y juegan un papel importante en la activación de las procaspasas. Las caspasas iniciadoras se encargan de activar a las caspasas efectoras que son las que llevan a cabo las funciones finales [5].

De manera natural, la apoptosis puede ser activada por dos vías: **intrínseca** y **extrínseca** (*Fig.1*). La vía extrínseca se activa después del acoplamiento de receptores de muerte con sus respectivos ligandos, los ligandos de muerte mejor descritos pertenecen a la familia de proteínas del factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés) los cuales comprenden a TNF- α , FasL y TRAIL y son producidos predominantemente por células del sistema inmune tales como linfocitos T, células NK, macrófagos y células dendríticas [17]. La unión ligando-receptor induce la formación del Complejo de Señalización Inductor de Muerte (CSIM) que recluta a proteínas adaptadoras, tales como FADD o TRADD, mediada por sus dominios efectores de muerte [5, 14]. Entonces las procaspasas 8 o 10 son atraídas por el CSIM en donde se auto activan, en consecuencia, se induce la activación de caspasas efectoras por el corte proteolítico de las iniciadoras [5]. En la vía intrínseca, la apoptosis es activada por varios estímulos de estrés, tales como privación de nutrientes, daño del ADN, radiación UV, fármacos antineoplásicos, etc. [14]. Estos estímulos inducen la pérdida de la Permeabilidad de la Membrana Externa Mitocondrial (PMEM) mediante la formación de poros por los miembros pro-

apoptóticos de la familia Bcl-2: Bax y Bak, lo cual permite la translocación de las proteínas mitocondriales al citoplasma tal como citocromo-c (Cyt-c). Consecuentemente, Cyt-c induce la formación de un complejo conocido como apoptosoma permitiendo así la auto activación de la caspasa iniciadora 9 [5]. Ambas vías culminan con la activación de las caspasas efectoras mediante el procesamiento proteolítico que las caspasas iniciadoras inducen sobre ellas [5]. Por su parte, las caspasas efectoras provocan la degradación de sustratos endógenos indispensables para la viabilidad, generándose así las características bioquímicas y morfológicas asociadas a la apoptosis, tales como son: condensación de la cromatina, disminución del tamaño nuclear, compactación del citoplasma, formación de fragmentos nucleares conocidos como cuerpos apoptóticos entre otras [14].

Es importante mencionar que, aunque la pérdida de la PMEM depende principalmente de la vía intrínseca, existe una regulación que permite el mismo fenómeno a partir de la activación de la vía extrínseca. Tal regulación, se da por el equilibrio entre las actividades de los miembros antiapoptóticos y proapoptóticos de la familia Bcl-2[18]. La activación de la caspasa 8 dada durante la vía extrínseca es capaz de procesar a un miembro proapoptótico de la familia Bcl2 conocido como Bid, generándose una proteína trunca denominada tBid [5]. Esta última actúa inhibiendo a proteínas antiapoptóticos de la familia Bcl-2 y consecuentemente activa a otras proteínas proapoptóticas tales como Bax y Bak, las cuales se ha mencionado anteriormente son importantes para la liberación de Cyt-c y la formación del apoptosoma[5]. Una vez activadas las caspasas iniciadoras a través de las vías de apoptosis extrínseca o intrínseca, el equilibrio entre las actividades de los miembros antiapoptóticos y proapoptóticos de la familia Bcl-2 determina en gran medida si una célula sufre o no apoptosis por la vía intrínseca. [18].

2.1 Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis

Al ser la apoptosis un proceso muy importante para las células, este se encuentra altamente regulado. Una manera de regulación se da por medio de una familia de proteínas denominadas **Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis (PIAs)** las cuales

se caracterizan por tener dominios BIR y en algunos miembros un dominio RING [6]. Los dominios BIRs están relacionados con la inhibición de las formas activas de las caspasas por su asociación física con ellas, mientras que el dominio RING induce la degradación de las proteínas asociadas a PIAs ya que promueve la ubiquitinación de ellas confinándolas a una degradación vía proteosoma [19]. La familia de genes PIAs es evolutivamente conservada y contiene ocho miembros en mamíferos: *XIAP*, *ciAP1*, *ciAP2*, *NAIP*, *Survivin*, *Bruce/Apollon*, *ML-IAP/Livina* y *hILP2*. Los tres primeros han sido caracterizados como represores de la apoptosis [6].

En principio existen dos maneras en las que se puede reprimir la apoptosis por inhibición de las caspasas: la primera es removiéndolas de la célula por el uso de la maquinaria de degradación proteosomal y la segunda es directamente inhibiendo su actividad enzimática[6]. Sorprendentemente, hay evidencia de que los miembros de la familia de PIAs son capaces de ejercer ambas funciones ya que presentan diferentes dominios que les dan las funciones ya mencionadas. Por ejemplo, *XIAP*, el miembro más potente de la familia de las PIAs, contiene tres dominios BIR y un dominio RING, los primeros le permiten inhibir la actividad enzimática de las caspasas 3,7 y 9 y el segundo actúa como una ligasa de ubiquitina promoviendo así la degradación de las caspasas 3 y 7 [7].

2.2 Antagonistas de las Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis

Existen proteínas que tienen la capacidad de regular negativamente la función de las PIAs, y existen dos que ya están bien caracterizadas y que son principalmente dependientes de la vía mitocondrial: *Smac/DIABLO* y *Omi/HtrA2*; Estas proteínas son capaces de interactuar con las PIAs desplazando las formas activas de las caspasas previamente retenidas por las PIAs y así antagonizar el efecto de estas últimas [20]. De esta forma, los antagonistas de las PIAs reactivan la apoptosis. Debido a que *Smac/DIABLO* y *Omi/HtrA2* son proteínas que solo son translocadas al citosol en condiciones de apoptosis, las funciones de estas proteínas dependen de la PMEM.

En la última década ha surgido el interés por el estudio de XAF1 (*XIAP-associated factor 1* o *X-linked IAP associated factor 1*), la cual es otra proteína con potencial antagonico sobre las PIAs; A diferencia de Smac/DIABLO y Omi/HtrA2, XAF1 es una proteína citosólica, lo cual tiene implicaciones profundas en la regulación de las PIAs, ya que las regula en forma independientemente de qué vía apoptótica se active [21].

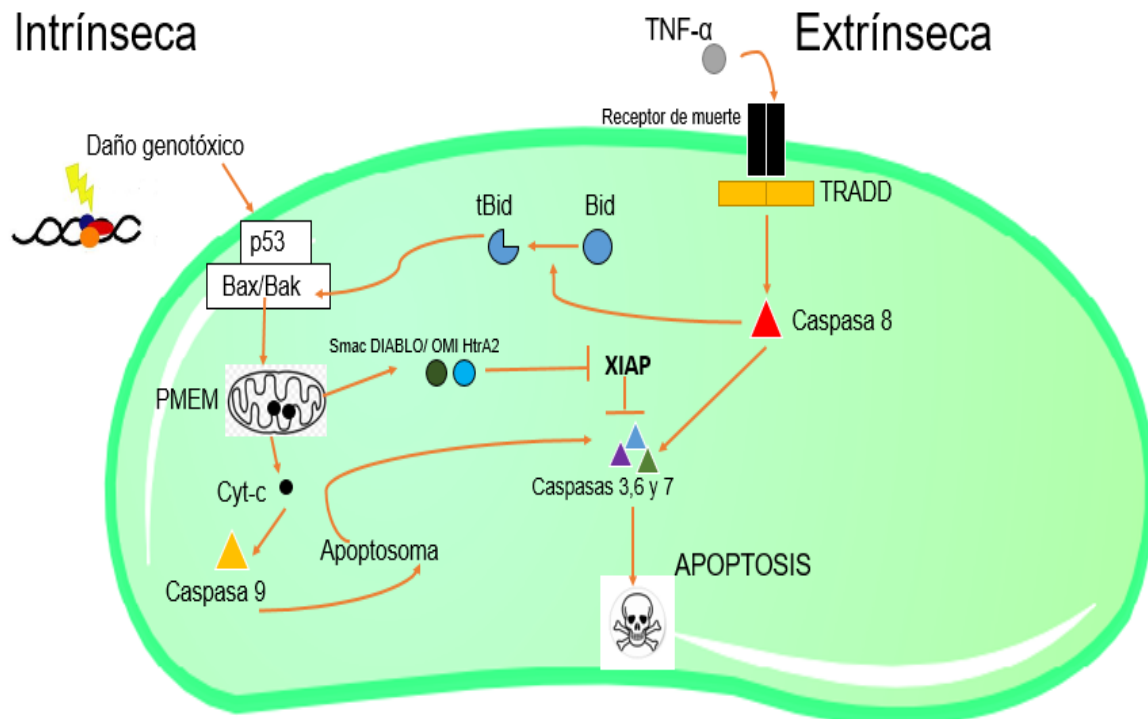


Fig.1. Esquema general de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis. Independientemente de la vía que se active, la culminación de la apoptosis se da por la activación de las caspasas efectoras. La vía intrínseca también puede ser activada a partir del corte proteolítico de Bid y la generación de una versión trunca de la proteína denominada tBid, a partir de la vía extrínseca.

3. XAF1

XAF1 fue inicialmente identificada como una proteína con 7 dominios de zinc capaz de unirse a XIAP [9]. Sin embargo, después se encontró que su estructura le permite inducir la translocación de XIAP al núcleo y de esta manera impedir su capacidad para interactuar con las caspasas [22]. Es importante destacar que junto a la interacción con XIAP, se ha descrito que XAF1 también podría interactuar con cIAP1, cIAP2, Livin, TslAP, y NAIP [23].

El gen que codifica para *XAF1* ha sido estudiado a nivel de estructura y expresión. Contiene 8 exones y actualmente se han descrito 6 isoformas generadas por procesamiento alternativo del ARNm. La isoforma *XAF1A*, es conocida como la isoforma larga y es la más estudiada; esta tiene 310 aminoácidos y su masa molecular calculada es de 33,1 kDa. *XAF1B* carece de 57 nucleótidos en la región de dedos de zinc por la ausencia de exón 3. La isoforma *XAF1C* contiene un exón crítico que incorpora un codón de paro en el marco de su lectura. *XAF1D* carece de los exones 4b y 5. Mientras que *XAF1E* carece de los exones 3, 4b y 5 estos ARNm tienen un marco de lectura abierto de 426 y 369 nucleótidos, respectivamente. Debido a un nuevo codón de paro en el exón 6, *XAF1D* codifica para una proteína de 141 aminoácidos y *XAF1E* codifica para una proteína de 122 aminoácidos[9, 24] (*Fig.2*).

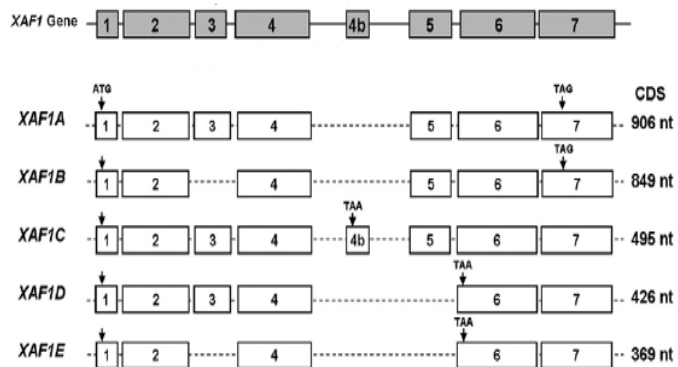


Fig. 2. Isoformas de XAF1 generadas por procesamiento alternativo. Tomada de referencia No 24.

3.1 Relación entre XAF1 y cáncer

XAF1 es considerado como un nuevo gen supresor de tumores el cual se encuentra silenciado en muchos tipos de cáncer, su expresión está ausente o disminuida en tumores gástricos, de ovario, pancreáticos, esofágicos, de colon y hepáticos, entre otros [24-27]. *XAF1* se expresa ubicuamente en tejidos normales y durante el embarazo [27]. De forma importante, se ha reportado que una expresión baja o nula de este gen está asociada a peores pronósticos clínicos como la metástasis y la resistencia a terapias antitumorales [24]. En este sentido, en los tumores metastásicos la supervivencia de los pacientes es muy baja.

La supresión de *XAF1* se observa en diversos tumores y en líneas celulares derivadas de estos, mientras que por el contrario, la sobreexpresión de *XIAP* correlaciona con un fenotipo canceroso [21]. Específicamente, se han efectuado estudios tanto en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer como en muestras evaluando el potencial biológico de *XAF1* en cáncer. Por ejemplo, en pacientes de cáncer de colon se determinaron los niveles de expresión de *XAF1*, *Smac/DIABLO* y *Omi/HtrA2*, debido a que las tres proteínas son antagonistas de las PIAs [24]. Curiosamente, de los tres antagonistas de *XIAP*, el único que presentó relación entre una baja expresión y estadios graves de la enfermedad fue *XAF1* [24]. Por lo tanto, parece que las acciones antagonistas que posee *XAF1* sobre *XIAP* necesitan ser eliminadas en una célula tumoral. Además, al comparar las muestras de tumores con las de tejido sano se observó que mientras los tejidos de células normales mostraban expresión basal de *XAF1*, las de tumores presentaban niveles de expresión muy inferiores [24] sugiriendo así un papel supresor de tumor.

Otro tipo de estudios que tienen gran impacto sobre la expresión de *XAF1* en cáncer, son aquellos en los que se expresa de manera ectópica la secuencia codificante de *XAF1*. Por ejemplo, en un experimento realizado en ratones inmunocomprometidos, se inyectaron células tumorales de diversas líneas celulares de cáncer de colon que fueron previamente infectadas con un adenovirus que sobreexpresaba *XAF1* [28]. Se observó que la expresión de *XAF1* inhibía la formación de tumores “*in vivo*” y también revertía los tumores previamente formados [28]. Siendo

así, se puede afirmar que la expresión de *XAF1* inducida por la expresión mediada por plásmido es suficiente para inhibir el crecimiento tumoral.

El hecho de encontrar nula o disminuida la expresión de *XAF1* en cáncer ha dado lugar a que diferentes grupos de investigación se cuestionen sobre los mecanismos involucrados en este silenciamiento, los cuales los podemos diferenciar en tres tipos de alteraciones: Aquellas estructurales en el ADN que llevan a la delección de genes tal y como ocurre en la pérdida de heterocigosidad, los mecanismos epigenéticos mediados por la metilación del ADN y los mecanismos transcripcionales.

3.2 La pérdida de heterocigosidad no está asociada al silenciamiento de *XAF1*

XAF1 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13.2), una región telomérica al gen *TP53* [9]. Inicialmente, análisis citogenéticos realizados en tejidos tumorales demostraron que la región cromosómica 17p13.1 a 17p13.3 es considerada como una región rica en genes supresores de tumores asociada a alteraciones genéticas [9, 22, 29]. Debido a que la pérdida de estos genes dada por el mecanismo de pérdida de heterocigosidad (PH) es común, se generó el razonamiento de que tal mecanismo ocurría también en el silenciamiento de *XAF1*.

La PH es un evento genético común en el desarrollo del cáncer, en este se encuentra involucrada la pérdida somática de alelos de tipo silvestre [30]. Para comprobar si por este mecanismo se explica el silenciamiento de *XAF1*, se utilizaron como marcadores genómicos regiones micro satélites tanto en líneas celulares como muestras gástricas de cáncer. En ellas se encontró que la PH del gen *XAF1* es un evento poco frecuente no relacionado con su silenciamiento transcripcional [31]. Otro estudio que llevó a la misma conclusión fue aquel en el que se utilizaron muestras de carcinomas colorectales primarios humanos, aquí se utilizaron marcadores polimórficos intragénicos tanto para *XAF1* como para *TP53* [24]. Además de darnos las conclusiones ya mencionadas, se encontró que en muy baja proporción se presentó PH en *XAF1* asociados a PH en *TP53*, por lo tanto, la pérdida de heterocigosidad de *XAF1* se produce independientemente de la delección de *TP53* [24].

El hecho de que la PH no sea el mecanismo responsable del silenciamiento de XAF1 en cáncer, se ha sugerido que mecanismos regulatorios alternativos como modificaciones epigenéticas y/o mecanismos transcripcionales sean responsables de dicha represión.

3.3 Hipermetilación en la secuencia promotora de XAF1

La metilación del ADN es un mecanismo epigenético cada vez más estudiado en la etiología del cáncer [10]. Cambios en los patrones de metilación del ADN particularmente en la región promotora de los genes en forma de hipometilación o hipermetilación pueden tener efectos importantes en la expresión de numerosos genes [10]. La hipermetilación en la región promotora de los genes está implicada en la inhibición de la expresión génica. Estudios de diversos tipos de cáncer han revelado que la metilación del ADN afecta a los genes implicados en diferentes vías celulares incluyendo la apoptosis [10].

Las ADN metil-transferasas denominadas DNMTs (*DNA Methyl-Transferases*, por sus siglas en inglés) convierten a la citosina en 5-metil-citosina. Actualmente existen ya varias moléculas aprobadas por la FDA (*Food and Drug Administration*) que han sido diseñadas para inhibir la actividad de estas enzimas las cuales son nucleótidos análogos tales como 5-azacitidina o 5-aza-2'-desoxicitidina. Estos agentes son utilizados para el tratamiento de leucemias [32].

Interesantemente XAF1 se ha reportado como un gen que presenta hipermetilación en la secuencia promotora en diferentes muestras de tumores y líneas celulares de cáncer [26, 33]. Tal metilación aberrante ocurre en los di-nucleótidos CpG [31, 33]. Una forma de activar la expresión transcripcional de XAF1 y otros genes sujetos a la represión por metilación es inhibiendo a las enzimas responsables de este cambio. El tratamiento con tales agentes induce reactivación transcripcional del gen XAF1 correlacionando su expresión con la muerte celular o la sensibilización de las células a la terapia convencional [15, 33-35]

3.4 Mecanismos transcripcionales asociados a la regulación de XAF1

Como se mencionó anteriormente, está bien establecido que las alteraciones estructurales del ADN no están asociadas con el silenciamiento transcripcional de *XAF1*, en cambio las modificaciones en su configuración epigenética sí lo están. Sin embargo, es fundamental describir los mecanismos reguladores transcripcionales, tanto los activadores como los represores, que están involucrados en la regulación de la expresión de este gen supresor de tumor.

3.4.1 Regulación positiva de la expresión de XAF1

Los genes estimulados con interferón, conocidos como ISGs por sus siglas en inglés *interferon-stimulated genes*, son genes cuya expresión es estimulada por el interferón IFN [36]. Los productos proteicos de estos genes controlan infecciones, tienen efectos antiproliferativos, antiangiogénicos e inductores de apoptosis [36]. Utilizando un análisis de micro arreglos de ADN se observó que en líneas celulares de melanoma el tratamiento de IFN- β induce la activación transcripcional de *XAF1*, considerándose como un ISG importante [37]. Otros estudios demostraron que *XAF1* sensibilizaba a las células a sufrir apoptosis mediados por tratamientos con IFN- β [37, 38]. El mecanismo por el cual IFN induce activación transcripcional de *XAF1* empieza con reconocimiento de IFN- β por su receptor induciendo la activación de Stat1 (*Signal transducer and activator of transcription 1*) y Stat2 (*Signal transducer and activator of transcription 2*) que se asocia con el elemento de respuesta estimulada por interferón (IRES) en el promotor de *XAF1*, induciendo así su activación transcripcional [38]. También, se ha demostrado que IFN- β podría inducir la activación de la quinasa N-terminal 1 c-Jun (JNK1) activando el factor regulador del interferón 1 (IRF1) que a su vez controla la activación transcripcional de *XAF1* a través de su asociación con el promotor de *XAF1* [39]. Tales mecanismos, explican la expresión de *XAF1* en un contexto no tumoral.

3.4.2 Regulación negativa de la expresión de XAF1

Es importante tener en cuenta los mecanismos represores de la transcripción de XAF1 en cáncer debido a que potencialmente pudieran modularse por pequeñas moléculas. En la actualidad existen únicamente dos proteínas que ha sido descritas como reguladoras negativas de la expresión de XAF1: HSF1 *Heat Shock Transcription Factor 1* y p53 [40, 41].

HSF1 es un factor de transcripción evolutivamente conservado que coordina la transcripción inducida por el estrés y dirige procesos fisiológicos versátiles en eucariotas [42]. Esta proteína ha demostrado en estudios elaborados con células de cáncer gástrico y de colon que su nivel de expresión está inversamente correlacionado con la expresión de XAF1, además se demostró que HSF1 interactúa directamente con el promotor de XAF1 (a través de la unión de un elemento de unión de HSF1 dentro de la región flanqueante 5') en condiciones inducidas por el estrés reprimiendo así su activación transcripcional [43].

Por otra parte, p53 es capaz de interactuar con el promotor de XAF1 y regularlo negativamente. La primera evidencia sobre esta relación se demostró al analizar la expresión de XAF1 y TP53 en muestras de tumores gástricos; en estos estudios se observó que la correlación de la expresión entre ambos genes era inversamente proporcional. Además, se evaluaron los efectos de la sobre-expresión de TP53 de tipo silvestre (wild-type) y una mutante de TP53 (mutante en el sitio de unión al promotor de XAF1) en la regulación transcripcional de XAF1. Se determinó que los niveles de expresión de XAF1 en células con una sobre-expresión de TP53 mutado fueron superiores a las de TP53 de tipo wild-type, y es que la mutarse el gen TP53 este genera un producto proteico (p53) incapaz de interactuar con la secuencia promotora de XAF1 [41]. En la actualidad se sabe que la regulación negativa de XAF1 por p53 es un mecanismo para evitar la duplicación de la función supresora de tumores que tiene XAF1 [41].

4. YY1 como regulador transcripcional

A pesar de conocer mecanismos transcripcionales que regulan la expresión de *XAF1*, el mecanismo molecular que explica los niveles más bajos de la expresión de este gen en cáncer no es del todo claro. En este sentido, es importante comprender el papel de moléculas reguladoras del estado de transcripción y/o de metilación del promotor del gen *XAF1*. Uno de los reguladores transcripcionales y epigenéticos mejor descritos es YY1 (Yin Yang 1) [13] el cual pudiera estar asociado a la regulación de la expresión de *XAF1*.

El factor de transcripción YY1 actúa como activador y represor de la transcripción [12]. Estructuralmente YY1 es estabilizado por iones Zn^{2+} y está formado por 4 dominios de dedos de zinc, estas secuencias tienen gran similitud con miembros de la familia *GLI-Krüppel*, tal familia comprende factores de transcripción en los cuales sus secuencias de unión a ADN y están formadas por dedos de zinc repetidos en tándem [44]. Funcionalmente, YY1 puede unirse directamente o indirectamente al ADN mediante la asociación con otros factores de transcripción o moléculas adaptadoras y regular de esta forma la transcripción [45]. Además, YY1 es un miembro de las proteínas del grupo *Polycomb*, la cual es una familia de proteínas que se caracterizan por su capacidad para remodelar la cromatina y así controlar la regulación epigenética [12]. La principal consecuencia de tal remodelaje es el silenciamiento transcripcional de los genes involucrados [46].

La expresión y actividad de YY1 se ha reportado en células normales y cancerosas. La mayoría de los tipos de cáncer muestran una mayor expresión de YY1. Específicamente, los niveles de expresión de YY1 se encuentran incrementados en **cáncer de próstata**, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de mama, entre otros [47-49].

Desde hace más de una década, se reportó una posible asociación entre la actividad de YY1 como represor transcripcional y la resistencia de las células tumorales a la apoptosis posicionando a YY1 como una proteína oncogénica [13]. Desde entonces diferentes grupos de investigación han contribuido a este conocimiento, en el que claramente YY1 está asociado con procesos malignos. Debido a que YY1 aumenta

supervivencia y/o promueve alteraciones en el control del ciclo celular mediante el programa transcripcional que induce en cáncer, se ha inhibido la expresión de YY1 para interferir con la resistencia de las células tumorales a la apoptosis [13]. Cabe señalar que la expresión de YY1 se ha correlacionado como posible marcador de pronóstico para el estado de la enfermedad o como indicador del comportamiento clínico de la progresión del cáncer [12]. En el caso de YY1 su sobreexpresión se encuentra asociado a peores pronósticos clínicos, lo cual lo ha llevado a considerarse como un biomarcador de la enfermedad[45].

Existen diferentes genes involucrados en cáncer que son regulados negativamente por YY1, por ejemplo: se ha reportado en diferentes tipos de cáncer que YY1 es capaz de unirse a la secuencia promotora de *Fas* (gen involucrado en la vía extrínseca de la apoptosis) y disminuir su expresión, esto resulta en una resistencia a la apoptosis mediada por Fas-FasL [50]. Así mismo encontraron que la inhibición de la actividad de YY1 aumentó la expresión de *Fas* y por lo tanto sensibilizó a las células tumorales a la apoptosis mediada por Fas[50]. Otro ejemplo de regulación negativa dada por YY1 es llevada a cabo en el receptor de muerte 5 (DR5). Este receptor se encuentra en la superficie de ciertas células que tienen la capacidad de unirse a su ligando denominado "TRAIL", su importancia terapéutica es muy relevante debido a que varios fármacos quimioterapéuticos en combinación con TRAIL dan como resultado una eliminación de la resistencia a la apoptosis [51]. Es importante mencionar que los estudios donde se determinó este mecanismo fueron realizados en la línea celular de cáncer de próstata PC3 [51].

5. Cáncer de próstata como modelo de estudio

La próstata es la glándula sexual accesoria más grande del sistema genital masculino, a su vez está compuesta de 30 a 50 glándulas tubo alveolares dispuestas en tres capas concéntricas. La función principal de la próstata consiste en secretar un líquido claro, levemente alcalino que contribuye a la composición del semen [57].

El epitelio prostático normal contiene células epiteliales lumbinales, células basales y un pequeño componente de células neuroendocrinas que están dispersas en la

próstata. La mayoría de los tipos de cáncer de próstata se clasifican como adenocarcinomas caracterizados por la ausencia de células basales y la proliferación incontrolada de células tumorales malignas con características de la diferenciación luminal incluyendo la formación glandular y la expresión de receptor de andrógenos (RA) y el antígeno prostático específico (APE) [58].

El cáncer de próstata es la neoplasia maligna más común en los hombres y la segunda causa principal de las muertes relacionadas con el cáncer. El cáncer de próstata ocurre generalmente en hombres de 65 años o más, y una vez formado, puede metastatizar de la glándula a otras partes del cuerpo[45].

Una de las terapias convencionales ampliamente prescritas para la atención del cáncer de próstata es la privación de andrógenos (TPA)[59]. Esta terapia consiste en reducir los niveles de andrógenos, en el cuerpo, o evitar que estas hormonas afecten a las células cancerosas de la próstata; uno de los métodos para lograrlo es la castración [59]. Aunque tal método es eficaz a corto plazo, se ha observado que en la mayoría de pacientes, la castración genera resistencia a la TPA, dando lugar a tumores más agresivos [15]. Gracias a los datos generados tanto *in vitro* como *in vivo* provenientes de modelos murinos y de pacientes con cáncer de próstata se ha encontrado que la pérdida o mutación de los genes *PTEN*, *ZBTB7A* y *TP53* está relacionada con la progresión del cáncer, así como en el desarrollo de la resistencia antes mencionada [15]. Este hecho permitió generar modelos murinos nulos para los genes *PTEN* y la combinación *PTEN/ZBTB7A* y *PTEN/TP53*, los cuales sirvieron para analizar patrones de expresión de diferentes genes asociados a la resistencia a TPA [15]. Curiosamente, se encontró que la expresión de XAF1 es significativamente baja en contraste con los genes XIAP y SRDD5A1 (gen involucrado con la conversión de la testosterona en dihidrotestosterona) [15]. La relevancia de tal estudio ha permitido proponer a XAF1 como biomarcador para la resistencia a la TPA dada por la castración, ya que específicamente, se identificó que la ausencia de este gen es necesaria para la resistencia observada, así mismo se identificó que los peores pronósticos clínicos se observan cuando XAF1 no está presente [15].

Debido a que está demostrado que, en el cáncer de próstata, YY1 [49] tiene un papel oncogénico y XAF1 se encuentra silenciado mediante mecanismos no asociados a daños estructurales en el ADN [26]. la presente tesis toma como modelo de estudio una línea celular de cáncer de próstata PC3. Esta línea es derivada de una metástasis ósea de un adenocarcinoma prostático de un hombre caucásico de 62 años. Es de crecimiento adherente y presenta morfología epitelial [59].

6. Antecedentes inmediatos al tema de investigación

Previamente, nuestro grupo de investigación, demostró que CTCF regula la configuración epigenética del gen *XAF1* a través de su interacción con la secuencia promotora de *XAF1* haciéndolo susceptible a la transcripción inducida por agentes activadores conocidos como el tratamiento con IFN- β o TNF- α . Sin embargo, en cáncer, existen una pérdida de la regulación de CTCF sobre el gen *XAF1* debido a que su sitio de unión al ADN ubicado en el promotor de *XAF1* es metilado y CTCF no puede interaccionar con este segmento. Este hecho induce el silenciamiento transcripcional de *XAF1* mediado por la adquisición de metilación de los dinucleótidos CpG y por la deposición de modificaciones post-traduccionales de histonas represivas [35]. Dado que CTCF y YY1 tienen la capacidad de interaccionar entre ellos regulando diversos genes a nivel transcripcional [11, 52, 53] y que además la expresión de YY1 está involucrada en procesos transcripcionales que favorecen la carcinogénesis, incluyendo el cáncer de próstata [45], en la presente tesis se propone a YY1 como un posible regulador transcripcional de *XAF1*. Esta idea está fundamentada por análisis bioinformáticos realizados. Brevemente, se realizó una búsqueda usando herramientas bioinformáticas [54] para determinar una probable asociación de YY1 en la secuencia promotora del gen *XAF1*. Se determinó la presencia de dos sitios de unión de YY1 (*Fig. 3*).

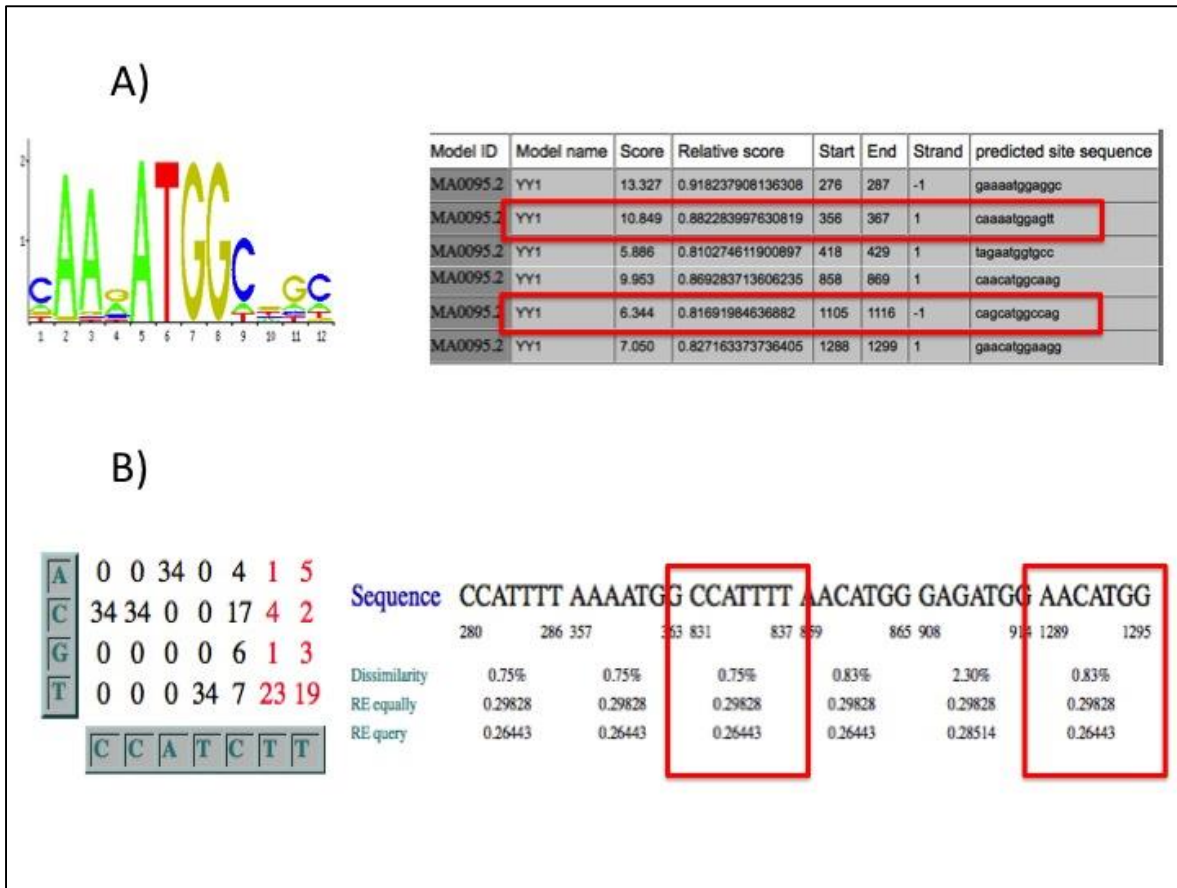


Fig. 3. Identificación de dos sitios de unión putativos de YY1 sobre la secuencia promotora de XAF1. Se obtuvo la secuencia promotora de XAF1 que abarca de -600 a +350 pb con respecto al sitio de inicio de la transcripción. Posteriormente se realizaron ensayos búsquedas bioinformáticas usando distintas herramientas disponibles. Se muestran los resultados de dos de ellas **A)** *Jaspar database* [55] y **B)** *PROMO transcription factor binding site prediction* [56]. En la parte izquierda de ambos incisos se indica la matriz de pesos usada para la comparación con la secuencia de interés. En la parte derecha se muestra los resultados obtenidos. Se seleccionaron los sitios indicados en rojo los cuales mejores valores de identidad con respecto a la matriz mencionada.

6.1 Hipótesis

-Debido a la identificación de dos sitios putativos de unión de YY1 sobre la secuencia promotora de *XAF1*, YY1 interaccionará con el promotor de *XAF1* y regulará su expresión transcripcional en la línea celular de cáncer de próstata PC3.

6.2 Objetivo general

-Determinar si YY1 regula la expresión de *XAF1* a nivel transcripcional.

6.3 Objetivos particulares

-Realizar ensayos de tipo gen reportero asociados a la secuencia promotora de *XAF1*.

-Realizar ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) para analizar la interacción entre la proteína YY1 y la secuencia promotora de *XAF1*.

- Analizar la expresión de *XAF1* con base a ensayos de pérdida y ganancia de función de YY1.

7. Metodología

A) Ensayos de tipo “gen reportero”

Subclonación de la secuencia promotora de XAF1 en el vector pGL3-Basic.

Con el uso de las enzimas XhoI y BamHI (New England Biolabs) se obtuvo la secuencia promotora de XAF1 (**inserto**) contenida en el vector 600-350XAF1-peGFPN1 (Clontech). Esta secuencia está formada por 950 pb, y comprende +350 pb respecto al sitio de inicio de la transcripción (SIT) y -600 respecto a este mismo sitio (*Fig.4*). Por otra parte, se realizó una digestión del plásmido pGL3-Basic (Promega) con las enzimas XhoI y BglII (**vector**). Dicho plásmido contiene como gen reportero a luciferasa *luc* y un gen de resistencia a Ampicilina *Amp^r*. Inserto y vector se purificaron en geles de agarosa por medio de un Kit comercial (PCR purification, QIAGEN), se cuantificaron por visualización con gel de agarosa usando el marcador de peso molecular (2-Log DNA Ladder, Biolabs); para el caso de la digestión de pGL3 fue necesario realizar una desfosforilación (Shrimp Alkaline Phosphatase, Biolabs) para evitar la recircularización del plásmido.

Posteriormente se realizó la ligación del **inserto/vector** en proporción 1:3 usando 50 ng del vector, mediante una ligasa (T4 DNA ligase, Biolabs). Después se realizó la transformación del producto de ligación en la cepa *E. coli* DH5 α las cuales fueron sembradas en placas de agar cerebro-corazón suplementadas con Amp (BD Bioxon). A las 18 horas de incubación a 37 °C, se amplificaron colonias en medio líquido cerebro-corazón (BD Bioxon) suplementados con Amp. Después de una noche de crecimiento, se extrajo el plásmido y para verificar la presencia de la inserción de la secuencia promotora de XAF1 en el plásmido generado, se realizaron mapas con enzimas de restricción, a este plásmido se le denominó **pGL3-XAF1prom.**

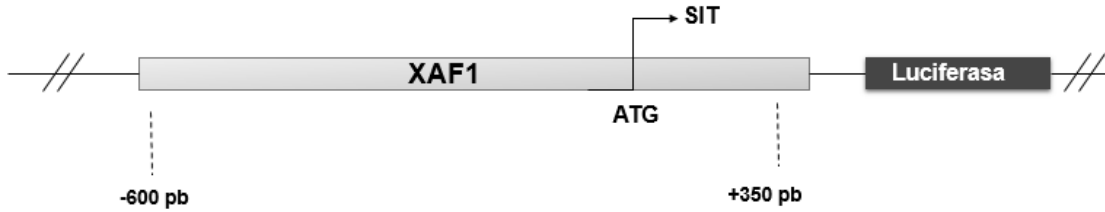


Fig.4. Subclonación del promotor de XAF1. Se muestra el segmento de la secuencia promotora de XAF1 correspondiente a -600pb y +350pb respecto al SIT. Esta secuencia fue subclonada en el vector pGL3-Basic, tal plásmido contiene como gen reportero a luciferasa.

Generación de las mutantes A y B por mutagénesis sitio-dirigida.

A partir de la clonación **pGL3-XAF1pro** y del diseño de iniciadores específicos para los sitios putativos de unión que incluían mutaciones (cambios de nucleótidos) se generaron dos diferentes mutantes denominadas **A y B** respectivamente. Es importante indicar que en el diseño de los iniciadores se sustituyeron los nucleótidos que reconoce el factor de transcripción YY1, generados por una matriz de peso (Fig.5). Las secuencias de tales iniciadores se muestran en la *Tabla. 1*.

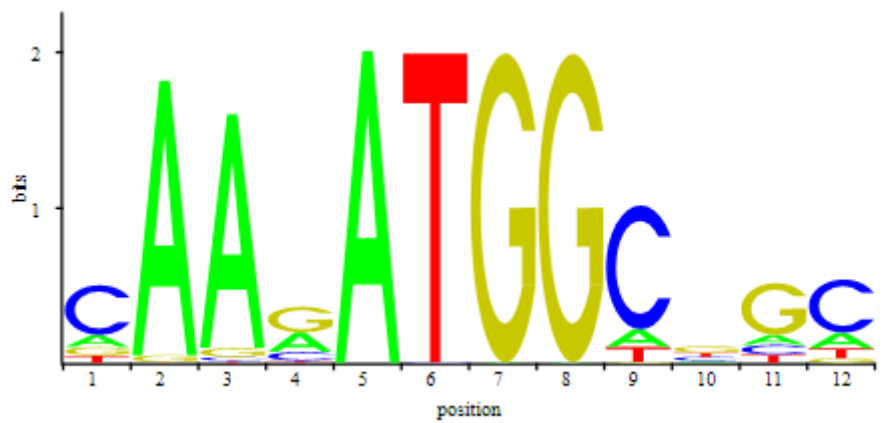


Fig. 5. Matriz de peso para el factor de transcripción YY1. Los nucleótidos que se encuentran en las posiciones 2,3,5,6,7 y 8, son los más representativos para la unión de YY1 a la secuencia de ADN. Por tal motivo, son aquellos que se modificaron en los iniciadores específicos para generar las mutantes en el promotor de XAF1.

Mutante	Iniciadores
A	5'GCACACCGAGAAGTCTCCTTC GGTACC CTGCTCTCTGCAGGCTTTCCGG 3' 3'CCGAAAGCCTGCAGAGAGCAG GGTACCGA AGGAGACTTCTCGGTGTGC 5'
B	5'GCTTGAATGCTGTTCCCTAAA GGTACC CTGGACTTCCAGGCGGTGAGG 3' 3'CCTCACCGCCTGGAAGTCCAGG GGTACC TTTTAGGGAACAGCATTCAAGC 5'

Tabla 1. Iniciadores utilizados para la incorporación de mutantes en el sitio de unión a YY1; en cursivas y negritas se indican los nucleótidos que fueron sustituidos.

Se utilizó el método de mutagénesis sitio-dirigida para generar las mutantes antes mencionadas; tal método comprende la incorporación de las mutantes deseadas por PCR, tomando como templado la construcción previa que se denominó **pGL3-XAF1pro** (Fig.6A). El protocolo para la amplificación de las mutantes consistió en generar 50 μ L de un mix de reacción (Kit Invitrogen, Taq Polimerasa "Platinum, High fidelity") a una concentración final de 2X con 1.5 μ L de cada uno de los iniciadores anteriormente descritos. A partir del mix, se generaron 5 tubos de reacción con un volumen final de 10 μ L, de tal manera que las temperaturas de alineación (T_m) fueron: 60 °C, 62 °C, 64 °C y 66°C. La reacción de PCR se corrió a 25 ciclos.

Para verificar los productos de amplificación se corrió un gel de agarosa al 1%. Enseguida se efectuó una digestión de los productos de PCR con la enzima Dpn-I, ya que esta enzima permite cortar en la secuencia GATC sólo si esta metilada y así eliminar el ADN plasmídico proveniente de bacterias sin afectar al sintetizado por la reacción de PCR, es decir plásmido *in vitro*. Después se realizó una purificación del producto en solución (PCR purification kit, QIAGEN) (Fig.6B). A continuación, se realizó una transformación de los plásmidos en la cepa ultracompetente *E. coli* Top 10(Invitrogen). Este método consiste en mezclar 25 μ L de bacterias ultracompetentes con 3 μ L de plásmido correspondiente a la mutante, a continuación, se realiza un choque térmico el cual consiste en 30 minutos a 4°C, 30 segundos a 42 °C y 3 minutos a 4 °C. Para restablecer el crecimiento bacteriano, se incubaron las bacterias a 37 °C en 500 μ L de medio SOC (rico en triptona y glucosa), finalmente se plaquearon y se dejaron en crecimiento durante 24 horas a 37 °C en

agar cerebro-corazón suplementado con Amp (BD Bioxon), posterior a este paso se seleccionaron colonias para el crecimiento de estas en medio infusión cerebro-corazón (BD Bioxon) y se extrajo el plásmido con un Kit comercial (Midiprep, Qiagen) (Fig.6C). Después de la transformación se verificó la generación de las mutantes generando mapas con enzimas de restricción que cortaran justo en la mutación que se introdujo en el plásmido (Fig.6D). Para verificar la presencia de dichas mutantes se incubaron los productos durante 2 horas con las enzimas mostradas en la Tabla 2 y se corrieron geles de agarosa al 1% (Ver anexo). Los plásmidos con las mutantes introducidas se denominaron: **pGL3-XAF1pro-MutA** y **pGL3-XAF1pro-MutB**.

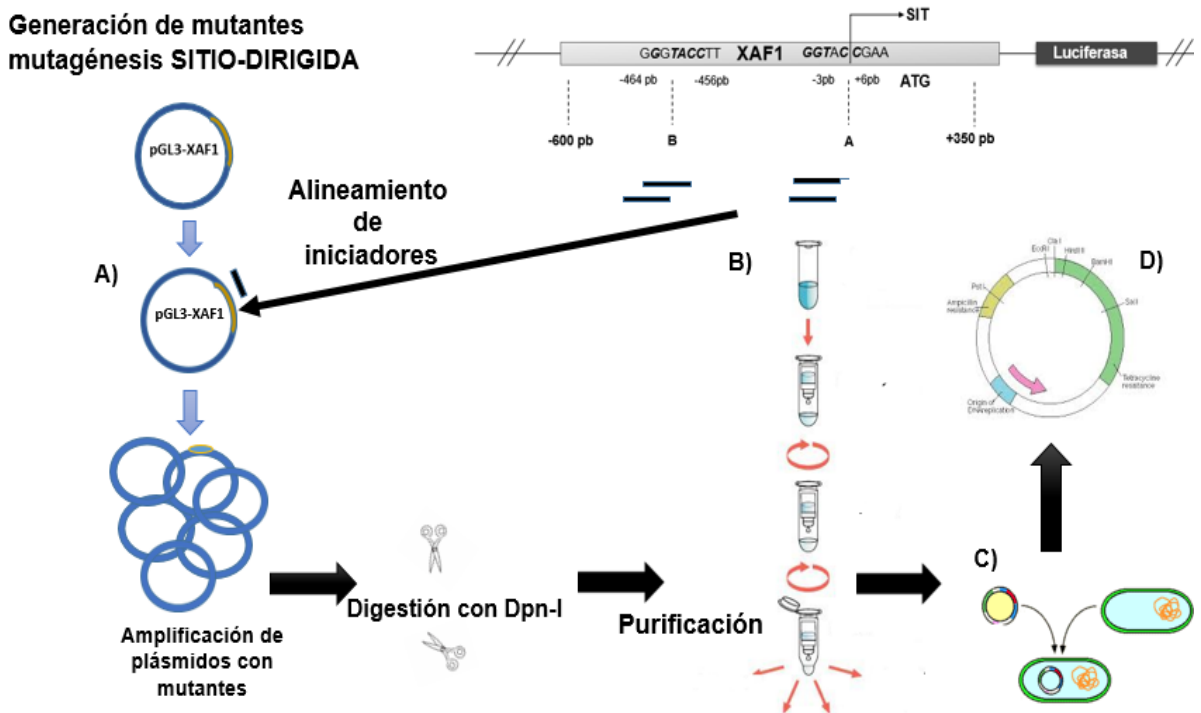


Fig.6. Esquema de la técnica de mutagénesis sitio dirigida. A) Alineación de los iniciadores específicos con el vector pGL3-XAF1pro. B) Purificación de los plásmidos pGL3-XAF1pro-MutA y pGL3-XAF1pro-MutB. C) Transformación de bacterias ultra competentes por el método de choque térmico. D) Construcción de mapas con enzimas de restricción para verificar la presencia de las mutantes. Los nucleótidos cambiados en los iniciadores, generaron un sitio de “novo” para el reconocimiento de enzimas de restricción.

Plásmido	Enzimas de restricción	Segmentos esperados (pb)
pGL3-XAF1pro-MutA	Kpn-I	-5121 -655
pGL3-XAF1pro-MutB	Nhe-I	-5,572 -204

Tabla 2. Se muestran las enzimas de restricción utilizadas para identificar las mutantes introducidas por el método de mutagenesis sitio-dirigida. Los segmentos esperados se obtuvieron a través de una clonación *in silico*.

Co-transfección de la línea celular PC3

Se sembraron 250,000 células de la línea celular PC3 en pozos de 35mm. Después de 24 horas, se efectuó una co-transfección transitoria de cada uno de los plásmidos generados (**pGL3-XAF1prom**, **pGL3-XAF1pro-MutA** y **pGL3-XAF1pro-MutB**) y un plásmido indicador de la eficiencia de transfección denominado pCMV-SPORT-βgal (Gibco), como su nombre lo indica este vector posee como gen reportero a β-galactosidasa (β -gal) de *E. coli*. Brevemente, para la co-transfección en un tubo se mezclaron cuidadosamente 400 μL de medio RPMI s/suero fetal bovino SFB (Gibco), 1.8 μg del plásmido **pGL3** con la mutante correspondiente y 0.2 μg del plásmido pCMV-SPORT-βgal. En otro tubo se mezclaron 400 μL de medio RPMI s/SFB con 2 μL de lipofectamina 2000 (Invitrogen). Ambas mezclas se dejaron reposar durante 5 minutos y al paso de este tiempo se adicionó la mezcla de lipofectamina al tubo con los plásmidos. Después de los 20 minutos, las células se lavaron dos veces con solución salina y finalmente se reemplazó el medio, con la mezcla de lipofectamina y los plásmidos correspondientes. Al paso de 4 horas se reemplazó el medio con 1000 μL de medio RPMI c/SFB.

Cuantificación de los genes reporteros β –gal y luciferasa

Después de 48 horas de la co-transfección se removieron las células por medio de una espátula flexible de plástico y se lavaron con solución salina. A continuación, se les adicionó amortiguador de lisis 5X en una dilución 1:5 y se sometieron las células a 2 ciclos de congelación continuos, entre las temperaturas de -70°C y 37°C . Finalmente, se centrifugaron a 8,500 RPM (x 6,761 g) durante 1 minuto a 4°C recolectando el sobrenadante que contenía la fracción soluble de las proteínas (proteína total).

Se determinó la cantidad de β –gal mediante el uso de un kit comercial luminiscente de β -galactosidasa (Clontech). Brevemente, en una placa de lectura de 96 pozos se adicionaron 40 μL de proteína total ,2 μL del Reactivo A (sustrato) y 98 μL del Reactivo B (amortiguador). Se dejó incubando durante una hora, con agitación en condiciones de oscuridad. Se procedió a la lectura de la actividad enzimática en el lector de placas (EnSpire, Beckman Coulter).

Se determinó la cantidad del gen reportero luciferasa mediante el uso de un Kit comercial (Luciferase assay reporter system, Promega), se adicionaron 40 μL de proteína total en placas de 96 pozos y 50 μL del reactivo para la determinación de luciferasa, la lectura de la actividad enzimática se realizó enseguida por medio del lector de placas (EnSpire, Beckman Coulter).

B) Inmunoprecipitación de la cromatina acoplado a PCR en tiempo real (ChIP-q-PCR)

Soluciones

- 1.-Formaldehído 37%
- 2.-Glicina 2.5 M en PBS
- 3.-Amortiguador de lisis: 50 mM Tris-HCl, pH=8; 10 mM EDTA; 1% p/v SDS; Inhibidor de proteasas.
- 4.-Amortiguador de dilución: 16.7 mM Tris-HCl, pH=8; 1.2 mM EDTA; 167 mM NaCl; 1.1% Tritón 100-x, 0.01 % p/v SDS; Inhibidor de proteasas.
- 5.-Solución low-salt: 20 mM Tris-HCl, pH=8; 2 mM EDTA; 150 mM NaCl; 1.1% Tritón 100-x, 0.01 % p/v SDS.
- 6.-Solución high-salt: 20 mM Tris-HCl, pH=8; 2 mM EDTA; 500 mM NaCl; 1.1% Tritón 100-x, 0.01 % p/v SDS.
- 7.-LiCl/detergente: 10 mM Tris-HCl, pH=8; 1 mM EDTA; 1 % deoxicolato de sodio, 1% NP-40, 0.25 M LiCl
- 8.-Amortiguador TE: 10 mM Tris-HCl; pH=8; 1 mM EDTA
- 9.-Amortiguador de elusión: 1 % p/v SDS, 0.1 M NaHCO₃ (Solubilizarse al momento)
- 10.-NaCl 5M

A partir de cultivos de la línea celular PC3 en condiciones normales (no tratadas) y células tratadas con 5-Aza-2'-desoxicitidina 25 μ M y Tricostatina A (TSA) durante 4 días. Se hicieron tratamientos con tripsina y se contaron 2.5 millones de células. Tales células fueron sometidas a un proceso de fijación entre el ADN y las proteínas con 5 μ L de una solución de formaldehído 1:10. La reacción se paró con 250 μ L de glicina y se centrifugaron las células. El pellet obtenido se trató con 500 μ L de amortiguador de lisis y posteriormente se fragmentó el DNA mediante un proceso de sonicación a las condiciones de 35% de amplitud por 5 minutos reposando durante 30 segundos por cada 30 segundos de sonicación, hasta obtener segmentos entre 200pb-400pb; los cuales fueron visualizados el corrimiento electroforético de un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para su inspección en el transiluminador. Después se centrifugó el sonicado a 12,500RPM

(x 14,521 g) durante 10 minutos a 8°C, recuperando de este modo el sobrenadante. Por duplicado, se tomaron 100 µL del extracto soluble y se le adiciono 900 µL del amortiguador de dilución, además se adicionó la cantidad necesario de inhibidor de proteasas para obtener una concentración 1X. Ambas muestras se les adicionó 10 µL de proteína G y se dejaron incubar durante 1.5 horas a 4 °C. Posteriormente, para retirar la proteína G, se centrifugaron las muestras a 8,000 RPM (x 5,989 g) durante 2 minutos. Finalmente, estas últimas se dejaron incubando toda una noche con su anticuerpo específico correspondiente: **Anti-YY1** (ChiP Grade, Abcam) y **Anti-IgG** (Anti-TFAM Cell Signaling). Después de 18 horas de incubación a 8°C, se realizó la inmunoprecipitación de los anticuerpos con la adición de 15 µL de proteína G. A las 1.5 horas de incubación, se efectuaron los lavados pertinentes con los amortiguadores: **Low-salt, high-salt, LiCl/detergente y TE**. Esta técnica consistió en adicionar 1 mL de cada uno de los amortiguadores en el orden antes mencionado y centrifugar a 8,000RPM (x 5,989 g) durante 1 minuto (descartando cada uno de los sobrenadantes obtenidos).

Después de los lavados, se eluyeron las dos muestras con 500 µL en amortiguador de elución. Finalmente, para revertir la fijación de ADN-proteínas se adicionaron 20 µL de una solución NaCl 5M y se dejaron en incubación toda una noche a 65 °C. De manera importante, se preparó una dilución 1:10 de ADN no inmunoprecipitado producto de la sonicación (Input) tratándose con la misma cantidad de NaCl 5M. Posteriormente, a las muestras se les adicionó 5 µL de proteinasa K y 10 µL de EDTA 0.5 M y se incubaron a 45°C durante 1.5 horas. Se purificó el ADN obtenido mediante un Kit comercial (PCR purification, Qiagen). Cantidades iguales de los fragmentos de ADN genómico fueron cuantificados por PCR en tiempo real (Thermo Scientific Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix 2X) usando como iniciadores control los complementarios a la secuencia promotora de gen GAPDH. Los sitios de interés para la posible unión de YY1 en el promotor de XAF1 fueron analizados con pares de iniciadores previamente diseñados que se denominaron Sitio-A y Sitio-B (*Tabla. 3.*)

Iniciadores específicos	Secuencia
Sitio-A	<p>Sentido: 5'-TGCCTGCAAGAAACGAAACTCAACC-3'</p> <p>Anti-sentido: 5'-ACCAGTTCCTGCACACCGAGAAG-3'</p>
Sitio-B	<p>Sentido: 5'-AGCCTCCCTGGACGCTGTTTG-3'</p> <p>Anti-sentido: 5'-CATCTCCGGCTCCCTTCTGGT-3'</p>

Tabla. 3. Iniciadores específicos para analizar la presencia de los sitios A y B en el DNA recuperado posterior al ChIP.

C) RT-PCR

Se realizó la extracción de ARN siguiendo el protocolo del reactivo comercial TRIzol (Invitrogen). Brevemente, se lisaron las células con 1 mL de TRIzol, a continuación, se incubó esta mezcla a temperatura ambiente durante 10 min y posteriormente se adicionaron 200 μ L de cloroformo. Se incubó en hielo durante 10 minutos. A partir de este paso, los demás pasos se realizaron a una temperatura de 4 °C. Se centrifugaron las muestras a 12 000 rpm durante 13 min a 4°C. Se recolectó la fase acuosa la cual corresponde a aquella que queda en la parte superior posterior a la centrifugación. Después, se precipitó el ARN mediante la adición de isopropanol en una relación 1:1. Se incubó durante 10 minutos y posteriormente se centrifugó, obteniéndose el pellet correspondiente al ARN. Finalmente, se lavó con etanol al 75 % y se retiró para dejar secar a temperatura ambiente el ARN precipitado. Se resuspendió el ARN en 40 μ L de H₂O libre de nucleasas. Después de la cuantificación del ARN obtenido se realizó una conversión de este a ADNc por medio de un Kit comercial (High capacity CDNA Reverse Transcription, Invitrogen). Se siguieron instrucciones del fabricante. Tal protocolo comprende la conversión de 2 μ g de ARN en un volumen total de reacción de 10 μ L. Se utilizaron como iniciadores de la reacción hexámeros aleatorios.

D) Ensayos de pérdida y ganancia de función

Silenciamiento de la expresión de YY1

Se sembraron 250,000 células de la línea celular PC3 en cajas de 35mm, (condiciones no tratadas y condiciones tratadas), se dejaron en crecimiento durante 24 horas y posterior a esto se transfectaron transitoriamente con liposomas (Lipofectamine RNAimax, Invitrogen). La transfección incluyó, 7 μ L de RNAimax y 25 pmol de tres diferentes SiRNAs específicos para YY1 y una secuencia aleatoria denominada "Scramble" (Integrated DNA Technologies). Después de 24 horas, se efectuó la extracción de ARN y después se realizó la técnica de PCR en tiempo real, midiendo los niveles de expresión de XAF1 y YY1 y GAPDH

Para la reacción de PCR en tiempo real (**q-PCR**) se utilizó el reactivo SYBR Green (Thermo Scientific Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix 2X), para cuantificar tales niveles de expresión. Se realizaron los cálculos pertinentes usando como método el cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [62]. Tal método expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores Ct del gen de interés y los valores Ct del gen control (GAPDH)[62].

Sobre-expresión de YY1

Se sembraron 250,000 células en cajas de 35mm, (condiciones no tratadas y condiciones tratadas), se dejaron en crecimiento durante 24 horas y posterior a esto se transfectaron transitoriamente con 2 μ L de lipofectamina (Lipofectamine 2000, Invitrogen) y 2 μ g de un plásmido denominado **pT-Rex-YY1**, el cual induce la sobre-expresión de YY1, como control negativo también se transfectaron la misma cantidad de células con el vector vacío denominado **pT-Rex-LacZ** (Thermo Fisher Scientific). Al paso de 24 horas se efectuó la extracción de ARN y después de realizar un RT-PCR anteriormente descrito, se cuantificaron los niveles de expresión de XAF1 y YY1 mediante una reacción de q-PCR, utilizando como reactivo fluorescente SYBR Green, el método utilizado para cuantificar los niveles de expresión fue $2^{-\Delta\Delta Ct}$, como gen constitutivo se analizó a GAPDH.

Resultados

A) Identificación de dos sitios putativos de unión para YY1 en la secuencia promotora de *XAF1*

Utilizando herramientas disponibles en línea para la predicción de sitios de unión de factores de transcripción, se identificaron dos sitios de unión putativos para el factor de transcripción YY1 en la secuencia promotora de *XAF1* que abarca de -600 a +350 pb respecto a su sitio de inicio de la transcripción (SIT). Los sitios de unión putativos se denominaron **Sitio-A** y **Sitio-B** y se localizan de -3 a +6 pb y de -464 a -456 pb respecto al SIT del gen *XAF1*, respectivamente. Consultando los datos de ChIP-Seq depositados en el proyecto ENCODE [63] que se obtuvieron mediante el uso de anticuerpos específicos de YY1, dos segmentos genómicos de interacción de YY1 con la secuencia promotora de *XAF1* se superponen con los Sitios A y B, anteriormente propuestos (Fig. 7A).

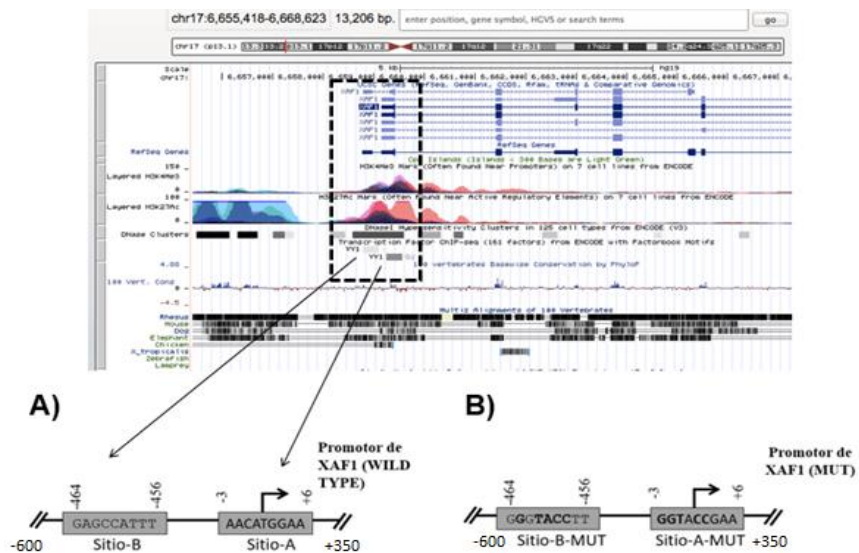


Fig. 7. Sitios putativos de unión para YY1 en el promotor de *XAF1*. A) Muestra los nucleótidos de los sitios A y B del promotor de *XAF1* para la posible unión de YY1, las flechas indican la superposición de estos dos sitios con los que se encontraron en la plataforma de ENCODE B) Corresponde a los sitios A y B con las modificaciones en los nucleótidos (marcados con negritas) introducidas mediante el método de mutagénesis sitio-dirigida.

B) YY1 reprime la expresión de XAF1

Se realizaron ensayos de tipo gen reportero para descubrir un posible papel regulador de YY1 en la expresión de *XAF1*. Se subclonó la secuencia promotora de *XAF1* (-600 a +350 pb) proveniente del plásmido peGFPN1-*XAF1*pro al plásmido pGL3 obteniéndose la construcción **pGL3-*XAF1*pro**. Este se caracterizó mediante mapas con enzimas de restricción. Después, se realizó mutagénesis sitio dirigida en los dos sitios putativos para el reconocimiento de YY1 (**Sitio-A** y **Sitio B**) generando las construcciones **pGL3-*XAF1*pro-MutA** y **pGL3-*XAF1*pro-MutB**. A continuación, la línea celular de cáncer de próstata PC3 se cotransfectó transitoriamente con los plásmidos: **pGL3** (plásmido vacío), **pGL3-*XAF1*pro**, o sus versiones mutantes antes mencionadas y con pCMV-Sport- β gal. A las 24 horas, se determinaron las actividades enzimáticas de los genes reporteros implicados. A partir de los valores obtenidos del control (pGL3), donde no se esperaba actividad enzimática por parte del gen reportero (debido a que en dicho plásmido no está subclonado el promotor de *XAF1*) se ajustaron los valores de tasa de cambio para las demás co-transfecciones, como era de esperarse la tasa de cambio para pGL3 mostró los valores más bajos, mientras que la versión **pGL3-*XAF1*pro-MutA** mostró una mayor expresión transcripcional del gen reportero (*Fig.8*). Con base a lo anterior, posiblemente el **Sitio-A** posee un papel represivo en la regulación transcripcional *XAF1*. Ya que hipotéticamente, al mutar tales sitios, YY1 pierde afinidad por el promotor de *XAF1* y por consiguiente la expresión del gen reportero se ve incrementada.

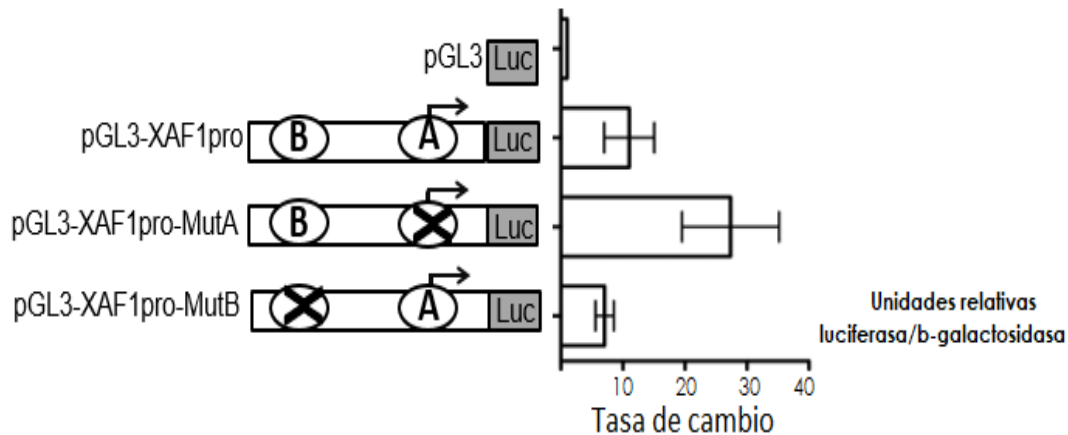


Fig.8. YY1 tiene un efecto represor sobre el Sitio-A de la secuencia promotora de XAF1. La gráfica corresponde a un triplicado experimental independiente de las co-transfecciones realizadas en la línea celular PC3 con los vectores generados en el procedimiento de mutagénesis sitio dirigida. En el eje de las X se graficó la tasa de cambio con respecto al cociente de la unidad relativa de la actividad del gen reportero luciferasa entre β -galactosidasa. La variación de los resultados se expresa mediante el error estándar de la media de tres experimentos independientes.

C) YY1 interactúa con el promotor de XAF1 en células que no expresan XAF1.

Debido a que YY1 regula la expresión de sus genes blanco mediante la interacción física con sus secuencias reguladoras de ADN [64, 65], se determinó si YY1 podría interactuar físicamente con la secuencia promotora del gen *XAF1* en la línea celular de cáncer de próstata PC3. Se ha mencionado anteriormente que la línea celular PC3 es un modelo susceptible debido a que la expresión de ARNm de *XAF1* está ausente y además no se han detectado alteraciones estructurales en el ADN [14]. Ensayos ChIP-qPCR se realizaron utilizando anticuerpos específicos para YY1. En primera instancia las células PC3 no fueron estimuladas con ningún tratamiento, a este grupo se le denominó: células **no tratadas**. Se interrogó la asociación de YY1 en los dos sitios putativo para YY1 mediante PCR en tiempo real. Se observó que existe una asociación específica de YY1 en los **Sitios A y B** (Fig.9), lo anterior apoya el posible papel represivo de YY1 en la expresión *XAF1* anteriormente mencionado.

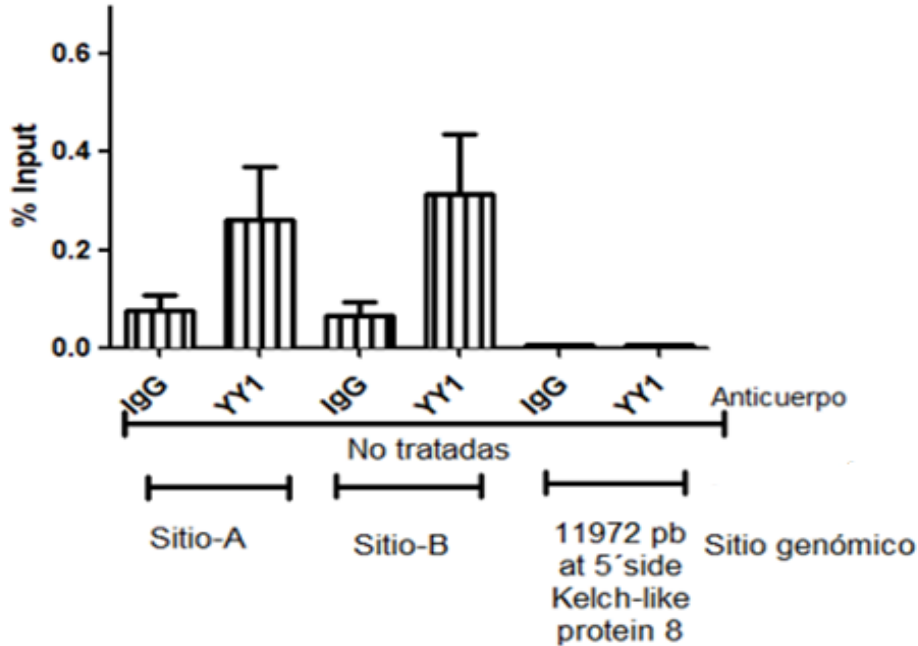


Fig.9. YY1 interactúa con la secuencia promotora de *XAF1* en células que no expresan *XAF1*. Se muestra los resultados obtenidos de la técnica ChIP acoplado a PCR en tiempo real. Se analizaron los datos con el método % de Input, para el grupo correspondiente a las células de la línea PC3 **no tratadas** en donde la expresión es ausente o nula de *XAF1*. El experimento está compuesto por seis experimentos realizados en forma independientes. La variación de los resultados se muestra mediante el error estándar de la media.

D) La reactivación transcripcional de *XAF1* es inducida por el tratamiento de agentes desmetilantes

Se ha demostrado previamente que, para varios tipos de líneas celulares de cáncer, la expresión de *XAF1* se reactiva mediante el tratamiento con agentes desmetilantes [26, 31, 34] como el co-tratamiento de 5-aza-2-deoxicitidina, un conocido inhibidor de metilación del ADN, y la Tricostatina A (TSA) que inducen re-activación transcripcional de genes silenciados [35]. Siendo así, se trataron células de la línea celular PC3 tanto con 5-aza-2-deoxicitidina y TSA. Mediante ensayos RT-qPCR se lograron medir los niveles de expresión para *XAF1*, *YY1* y *GAPDH* (gen control). Se observó reactivación transcripcional de *XAF1* por el tratamiento con agentes desmetilantes (Fig.10).

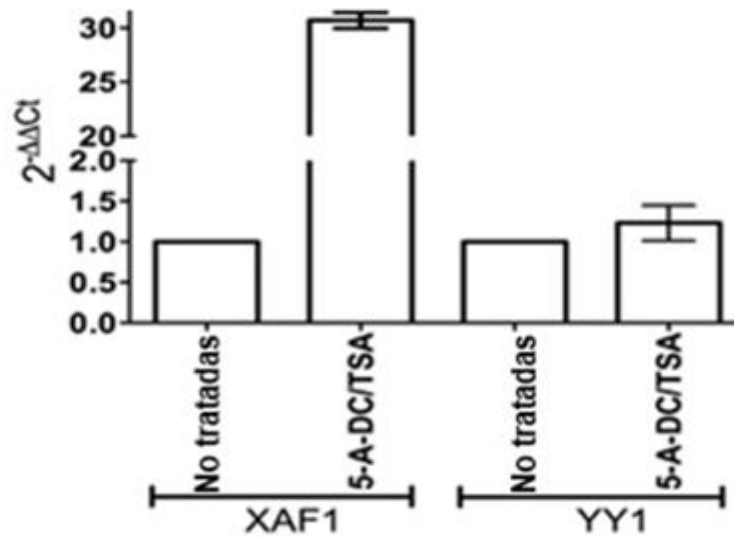


Fig.10. Determinación de la expresión relativa de los genes *XAF1* y *YY1* en células estimuladas con agentes desmetilantes. Se trataron células PC3 con 5-aza-2-deoxicitidina y TSA durante 4 días consecutivos. Posteriormente, se realizó RT-PCR para determinar los cambios en la expresión de *XAF1*, *YY1* y *GAPDH*. Los resultados fueron analizados con el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. La variabilidad de los resultados se muestra mediante el error estándar de la media obtenido de dos experimentos independientes.

E) *YY1* no interactúa con la secuencia promotora de *XAF1* en células tratadas con agentes desmetilantes

Una vez determinado las condiciones en la cual se induce la activación transcripcional de *XAF1*, se inspeccionó si existía un cambio en la afinidad de *YY1* por la secuencia promotora de *XAF1*. Se realizaron ensayos ChIP acoplado a PCR en tiempo real en células previamente tratadas con 5-aza-2-deoxicitidina y TSA. Se utilizaron anticuerpos específicos para *YY1*. Se observó una pérdida de la interacción de *YY1* en el promotor de *XAF1* (Fig. 11). La reactivación transcripcional del gen *XAF1* se correlaciona con la pérdida de la asociación de *YY1* tanto para el **Sitio-A** como para el **Sitio-B** de la secuencia promotora de *XAF1*.

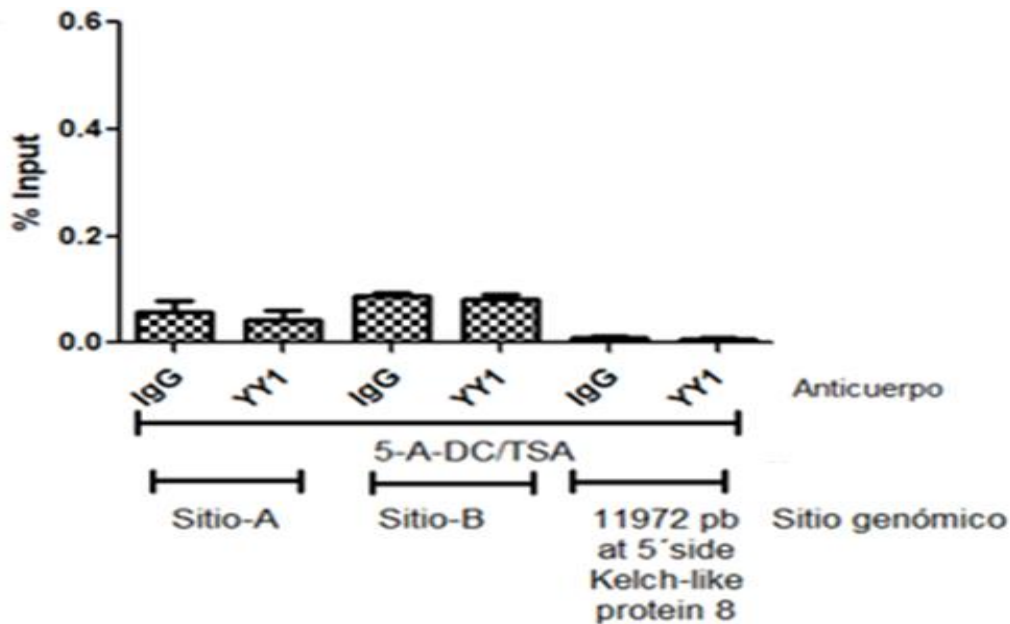


Fig. 11. La reactivación transcripcional de XAF1 se correlaciona con la pérdida de la interacción de YY1. Se trataron las células PC3 con 5-aza-2-deoxicitidina y TSA durante 4 días consecutivos. Se muestran los resultados obtenidos de la técnica q-ChIP analizados con el método % de Input de las células tratadas. La gráfica está compuesta por 3 experimentos independientes y se representa el valor de dispersión de los resultados mediante el error estándar de la media.

F) La regulación negativa de YY1 aumenta la expresión de XAF1.

Debido a que la asociación física de YY1 en la secuencia promotora de *XAF1* en condiciones “no tratadas” correlaciona con la represión transcripcional de *XAF1*, se analizó si la inhibición de la expresión de YY1 podría activar la expresión de *XAF1*, efecto similar al de la pérdida de la interacción de YY1 con en el promotor de *XAF1* inducido por el tratamiento con agentes desmetilantes (Fig. 9). Las células PC3 no estimuladas se transfectaron transitoriamente con SiRNAs específicos contra YY1 o con SiRNAs con secuencias aleatorias que están diseñados para no inhibir algún gen (SiRNAs controles). Después de 24 horas, se realizó RT-qPCR para medir la expresión de *XAF1*, *YY1* y *GAPDH*. La expresión de *XAF1* se incrementó por la inhibición de la expresión de *YY1* mediante la transfección de SiRNAs específicos contra YY1 y no con los SiRNAs controles (Fig. 12B) lo anterior apoya

el papel represivo de YY1 en la regulación *XAF1* que se ha propuesto. Siendo que las células PC3 tratadas con agentes desmetilantes inhiben la interacción de YY1 con el promotor de *XAF1*, se trataron células con agentes desmetilantes previamente a la transfección de SiRNAs específicos contra *YY1* o con SiRNAs controles. Como era de esperar, no se observó ningún cambio significativo en la expresión de *XAF1* en células transfectadas con SiRNAs contra YY1 en comparación con las células transfectadas con SiRNAs controles (*Figura 12B*). Como punto de vista complementario, se transfectaron células PC3 con un plásmido que sobre expresan la secuencia codificante de YY1 (pT-Rex-YY1) o con el vector vacío (pT-Rex) tanto en células no estimuladas como en células previamente desmetiladas. Se comprobó la sobre-expresión de YY1 en las células transfectadas con pT-Rex YY1 comparadas con el vector vacío (*Fig. 12C*). No se observó ningún cambio significativo en los niveles de expresión de *XAF1* entre las células control y las células que sobre-expresaron a YY1 (*Fig. 12D*). Estos resultados se esperaban por el hecho de que las células PC3 expresan constitutivamente altos niveles de YY1. En general, la pérdida de la interacción de YY1 con el promotor de *XAF1* inducido por la inhibición específica de YY1 mediada por SiRNAs o con un tratamiento de agentes desmetilantes inducen la expresión de *XAF1*, esto apoya la función represiva de YY1.

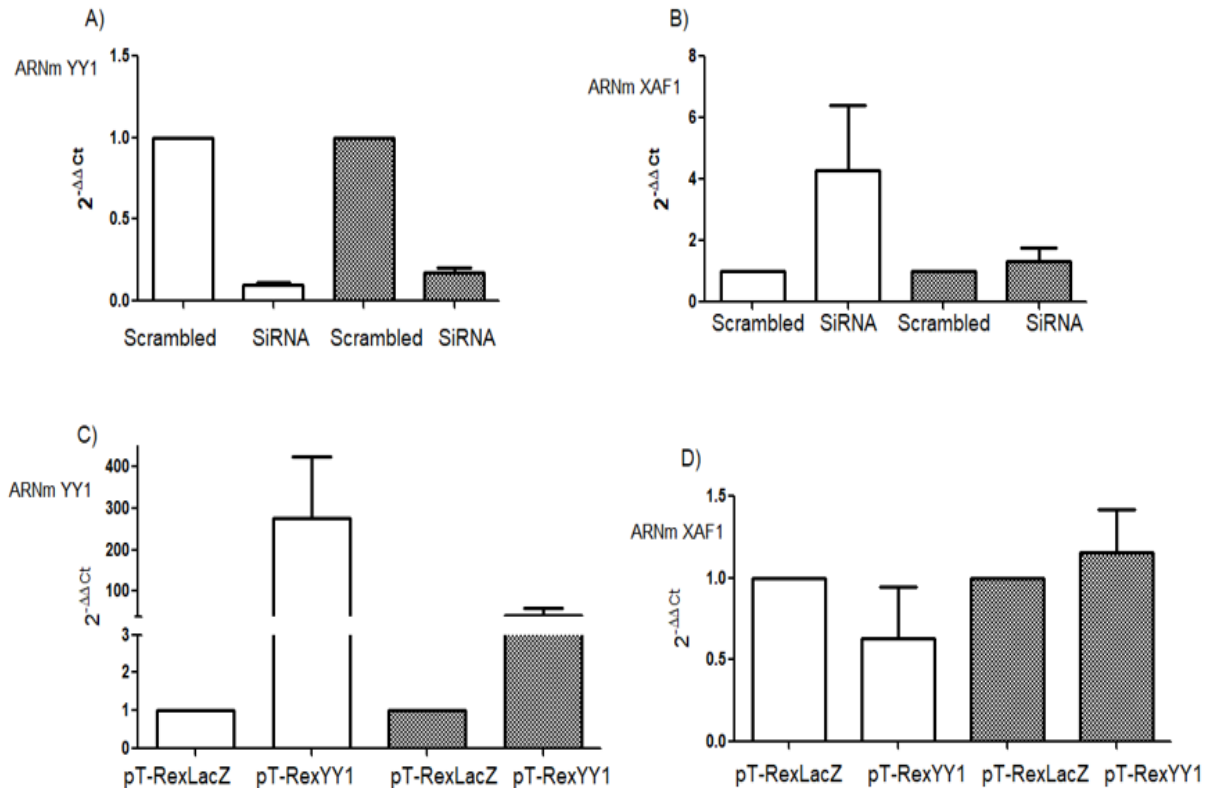


Fig. 12. La regulación negativa de YY1 aumenta la expresión de XAF1. Blanco (células no tratadas), Negro (células tratadas con agentes desmetilantes) **A)** La gráfica muestra expresión relativa de YY1 de células no tratadas o previamente tratadas con agentes desmetilantes tras la transfección con SiRNAs específicos para YY1 o SiRNAs controles. Se confirma que los SiRNAs específicos contra YY1 inhiben la expresión de YY1. **B)** Se muestran la expresión relativa de *XAF1*, de células no tratadas o previamente tratadas con agentes desmetilantes tras la transfección con SiRNAs específicos para YY1 o SiRNAs controles. La inhibición de la expresión de YY1 correlacionada inversamente con la expresión de *XAF1* en condiciones no tratadas. Tanto en los incisos A y en B, se graficó tres experimentos independientes y el error estándar de la media. **C)** Muestra los valores de expresión relativa de YY1 al transfectarse las células con un vector que induce sobreexpresión de YY1 posterior al tratamiento con agentes desmetilantes o en células sin tratamiento. **D)** Muestra los valores de expresión relativa de *XAF1* cuando se sobreexpresa a YY1. No se observan cambios, en la expresión de *XAF1* tras la expresión ectópica con YY1. La dispersión de los datos se muestra con el error estándar de la media de tres experimentos independientes

Discusión

El factor de transcripción YY1 regula sus genes blanco a través de la interacción directa con sus secuencias reguladoras de ADN [49]. De esta forma, en cáncer, este factor induce un programa transcripcional asociado a la carcinogénesis y/o a la resistencia a la terapia anti-tumoral. Específicamente, YY1 tiene un papel clave en el cáncer de próstata donde diversos grupos lo han identificado como una proteína blanca para el potencial desarrollo de una terapia anti-tumoral específica [48]. Sin embargo, la expresión de YY1 está presente en diversos tipos celulares normales por lo que su inhibición pudiera comprometer la función de órganos o tejidos sanos. En este sentido, es preciso identificar cuáles son los genes blancos que regula YY1 para proponer la modulación inversa de aquellos genes que le confieren su potencial oncogénico [49]. Es decir, la identificación de nuevos blancos para el diseño racional de terapias anti-tumorales novedosas.

El modelo estudiado consistió en una línea celular tumoral derivada de cáncer de próstata, debido a que en este tipo de tumor se tiene la certeza de las acciones carcinogénicas de YY1, y la baja expresión de *XAF1*. El diseño experimental del trabajo permitió en primera instancia, generar un sistema capaz de inferir un posible papel regulador de YY1 sobre el promotor de *XAF1*. Específicamente, los ensayos de gen-reportero nos sugirieron la presencia de un sitio de unión a YY1, **Sitio-A**, con actividad represora (*Fig.8*) el cual fue confirmado por los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (*Fig.9*). Sin embargo, es importante mencionar que el hecho de no observar actividad reguladora para el **Sitio-B** en los ensayos de gen-reportero (*Fig.8.*), pero si un comportamiento similar al **Sitio-A** mediante los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (*Fig 9*), no indican un resultado contradictorio respecto al **Sitio-B**. El hecho de que el **Sitio-B** carezca de implicaciones en la regulación de *XAF1* mediada por YY1 en los ensayos de gen-reportero es consecuencia de que este tipo de ensayos solo permiten analizar una determinada sección del gen, en este caso la secuencia clonada incluyó -600 a +350 pb respecto al SIT. De tal manera que los elementos de regulación distales no están contemplados. En este sentido, es importante indicar que YY1 es capaz de atraer secciones genómicas distales para regular la expresión del gen en cuestión [52].

Reconociendo que las ubicaciones de los elementos distales de regulación se encuentran aproximadamente a distancias más lejanas que +1000 o -1000 pb respecto al ATG [66], esta tesis indica que en YY1 interacciona con el sitio B (*Fig.9*) correlacionando con la represión de la transcripción de XAF1 y junto con los ensayos con gen-reportero (*Fig.8*) sugieren que las acciones represoras de YY1 en el sitio-B pudiera estar asociadas a la atracción de un elemento distal con características represoras. Por lo tanto, esta tesis abre otras preguntas de investigación: ¿Qué elementos distales mediados por YY1 se encuentran asociados a la regulación transcripcional de XAF1? ¿Existe configuraciones tridimensionales mediadas por YY1 que estén implicadas en la activación o silenciamiento transcripcional de XAF1? Sin duda, estas preguntas pudieran ser abordadas por nuevas metodologías como ensayos de inmunoprecipitación de cromatina del tipo 3C [67].

La técnica de inmunoprecipitación de la cromatina nos permitió interrogar si YY1 podía interactuar con regiones específicas de ADN, en este caso la secuencia promotora de XAF1 en dos condiciones: A) en aquellas que la expresión de XAF1 fuera prácticamente nula, tal y como ocurre en la línea celular tumoral PC3, y B) donde se reactivara transcripcionalmente la expresión de XAF1 mediante moduladores epigenéticos como el 5-aza-2´deoxicitidina y la Tricostatina-A. Los resultados obtenidos apoyan el papel represivo de YY1 en la regulación transcripcional de XAF1 propuesto en esta tesis, ya que la asociación de YY1 en la secuencia promotora de XAF1 se pierden cuando se logra aumentar la expresión de XAF1 en la línea celular PC3. Por otra parte, experimentos que soportan el papel represor de YY1 en la regulación transcripcional de XAF1 fueron realizados mediante la inhibición de YY1 por la transfección de SiRNAs específicos contra YY1. En condiciones basales, los SiRNAs indujeron reactivación transcripcional de XAF1 soportando la hipótesis de que YY1 es su regulador negativo. Estos experimentos mimetizaron la condición “*perdida de interacción de YY1 en la secuencia promotora de XAF1*” observada en condiciones de activación transcripcional de XAF1 mediada por el tratamiento con moduladores epigenéticos.

Si bien, la investigación realizada en esta tesis se enfoca en una línea celular de cáncer de próstata, existen bases de datos, en las cuales se reporta la expresión de diversos genes en muestras de pacientes con diversos tipos de cáncer, esto nos permite explorar los resultados obtenidos en esta investigación con lo reportado en la clínica. Uno de los servidores es ONCOMINE donde se almacenan resultados de ensayos de microarreglos de expresión de ARNm [68]. Un microarreglo de expresión es básicamente una técnica molecular que permite mediante una serie de sondas de ADN unidas a un soporte sólido estudiar la expresión de numerosos genes en una muestra biológica. El ARNm de la muestra biológica (en este caso, una muestra de ARNm de un cancer de próstata) es convertido a ADNc (por la enzima transcriptasa reversa) y marcado fluorescentemente para posteriormente hibridarlo con el soporte sólido que contiene secuencias de ADN que son complementarias para los ADNc de distintos genes. Después de realizar diversos lavados, se detecta con el marcaje de una sustancia fluorescente [68]. Posterior al procesamiento de datos, podemos determinar los niveles de expresión de los genes presentes en la muestra biológica en cuestión. La principal ventaja con respecto a las técnicas de biología molecular, como PCR es que pueden detectar miles de genes en un único procesamiento [68].

En el servidor de ONCOMINE se depositan los resultados de microarreglos de expresión de distintos tipos tumorales. Brevemente, en este servidor realizamos un análisis diferencial tipo “cáncer de próstata contra tejido normal”, de manera específica para la expresión de *XAF1* y *YY1* del universo de genes que se miden en un microarreglo de expresión. Se diferenciaron los resultados en función de la escala de *Gleason* que se les asigno a las muestras de pacientes que con adenocarcinomas de próstata. La escala de *Gleason* es un sistema utilizado para medir el grado de agresividad de un cáncer de próstata[69], basándose en la observación al microscopio de las características que presentan las células de la muestra obtenida en una biopsia del órgano [69]. El procedimiento consiste en asignar dos números que van del 1 al 5 [69]. Son dos números debido a que el primero describe el patrón celular más abundante y el segundo, el patrón más abundante. Las células con puntaje cercano a 1 se consideran células tumorales de

"bajo grado" y tienden a tener un aspecto similar a las células normales [69]. Las células con puntaje cercano a 5 se consideran de "alto grado" y no muestran características de células normales. En términos generales, se realiza la suma de los dos puntajes asignados a una muestra tumoral y los puntajes de *Gleason* más bajos (2 - 4) tienden a ser menos agresivos, mientras que los cánceres con puntajes de *Gleason* más altos (7 - 10) tienden a ser más agresivos [69]. Con base a esto, y al análisis anteriormente descrito se observó que al igual de lo reportado en la presente tesis, existe una correlación inversa entre la expresión de *XAF1* y la expresión de *YY1*, y que además esta correlación se encuentra directamente relacionada con la agresividad del cáncer, es decir, entre más agresivo se encuentre, los niveles de expresión de *XAF1* son menores y los de *YY1* mayores (Fig.13.)

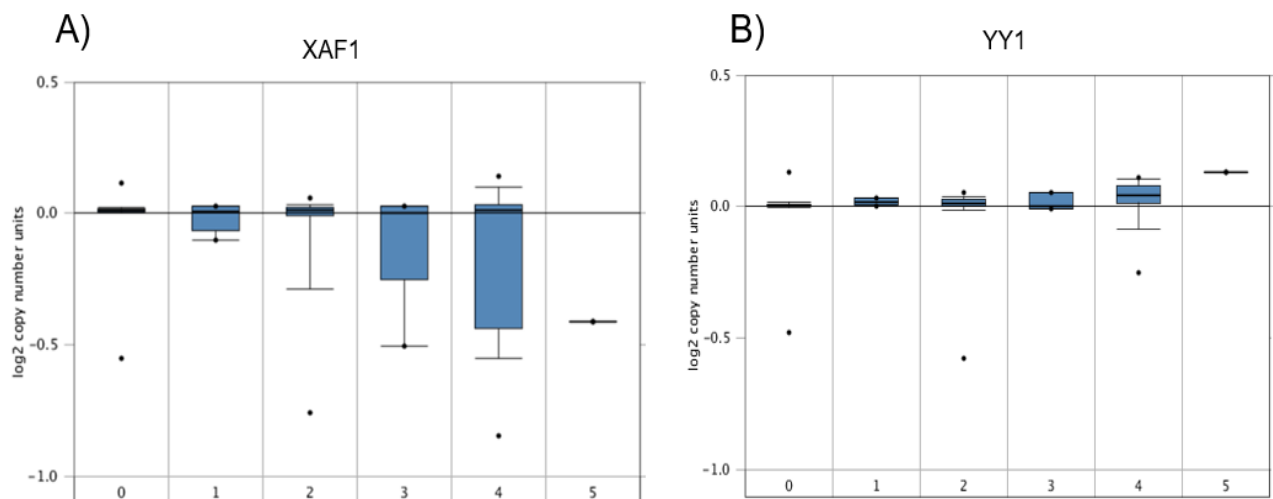


Fig.13. El grado de agresividad en adenocarcinomas de próstata se correlaciona inversamente con la expresión de *XAF1* y directamente con la expresión de *YY1*. Muestra el análisis obtenido a través del servidor ONCOMINE. Los números representados en el eje de las "X" representan los siguientes valores equivalentes a la escala de Gleason.

#	Escala Gleason
0	0
1	6
2	7
3	8
4	9
5	10

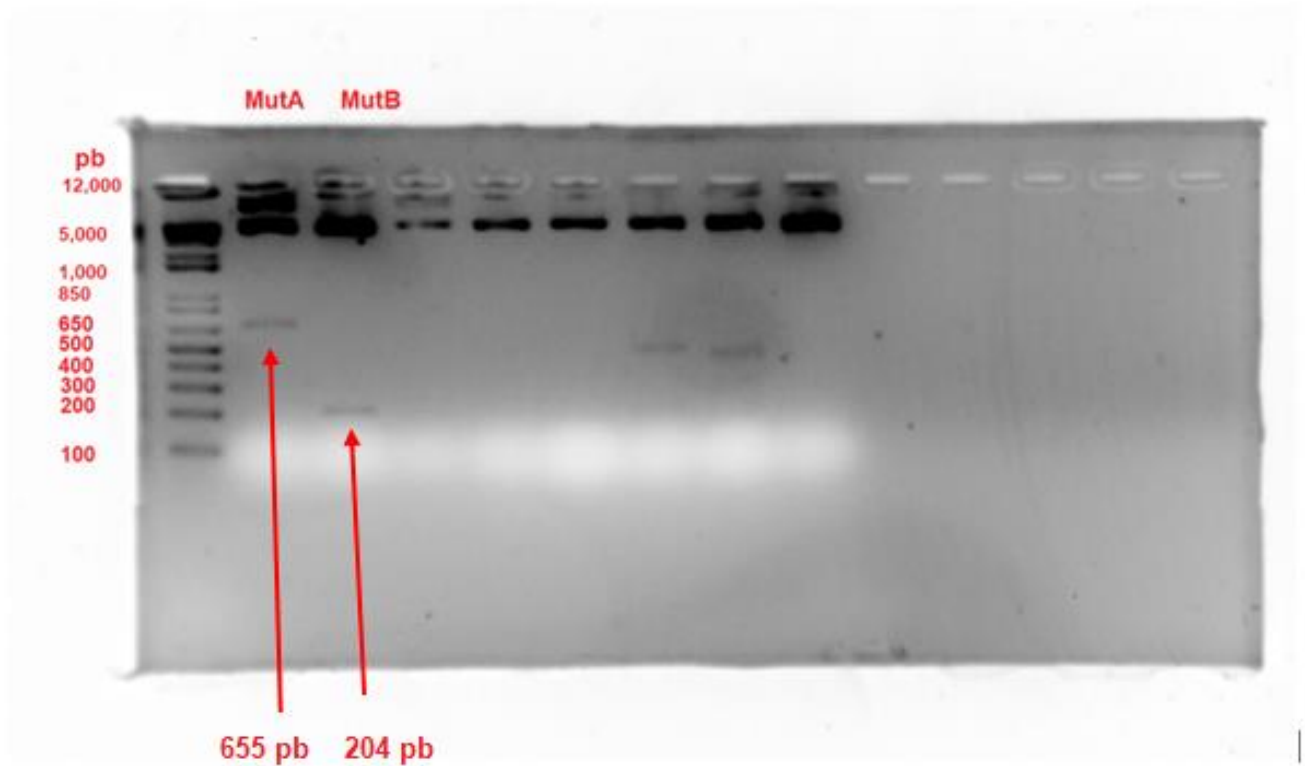
Finalmente, y dado que YY1 es una proteína que interacciona con CTCF y que nuestro grupo de investigación previamente caracterizó que CTCF regula la configuración epigenética de XAF1, estos hallazgos demuestran que la regulación transcripcional de XAF1 es mediada por YY1, por lo tanto, se abre otra nueva pregunta de investigación: ¿Cuáles son las implicaciones epigenético-transcripcionales mediadas por la co-regulación de CTCF y YY1 en la expresión del gen XAF1 en cáncer?

Conclusiones

El objetivo de esta tesis fue determinar el papel de YY1 en la regulación transcripcional de XAF1 en un modelo de cáncer de próstata. Los resultados obtenidos a través de los diferentes ensayos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. YY1 tiene afinidad por la secuencia promotora de XAF1 en los sitios de unión propuestos.
2. La asociación de YY1 en la secuencia promotora de XAF1 reprime la transcripción de XAF1

Anexo



Anexo1. Muestra los mapas con enzimas de restricción para la Mutante A y la Mutante B. Estos mapas permitieron verificar la generación de los mutantes por el método de mutagénesis sitio-dirigida

Referencias bibliográficas

1. Hyndman, I.J., *Review: the Contribution of both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours*. *Cancer Microenviron*, 2016. **9**(1): p. 63-9.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
3. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. *Toxicol Pathol*, 2007. **35**(4): p. 495-516.
4. Sadowski-Debbing, K., et al., *Caspases--their role in apoptosis and other physiological processes as revealed by knock-out studies*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2002. **50**(1): p. 19-34.
5. Shalini, S., et al., *Old, new and emerging functions of caspases*. *Cell Death Differ*, 2015. **22**(4): p. 526-39.
6. Vasudevan, D. and H.D. Ryoo, *Regulation of Cell Death by IAPs and Their Antagonists*. *Curr Top Dev Biol*, 2015. **114**: p. 185-208.
7. Eckelman, B.P., G.S. Salvesen, and F.L. Scott, *Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family*. *EMBO Rep*, 2006. **7**(10): p. 988-94.
8. Fulda, S., *Targeting inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) for cancer therapy*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2008. **8**(5): p. 533-9.
9. Plenchette, S., et al., *The role of XAF1 in cancer*. *Curr Opin Investig Drugs*, 2007. **8**(6): p. 469-76.
10. Gopisetty, G., K. Ramachandran, and R. Singal, *DNA methylation and apoptosis*. *Mol Immunol*, 2006. **43**(11): p. 1729-40.
11. Schwalie, P.C., et al., *Co-binding by YY1 identifies the transcriptionally active, highly conserved set of CTCF-bound regions in primate genomes*. *Genome Biol*, 2013. **14**(12): p. R148.
12. Zhu, W., S.Y. Olson, and H. Garban, *Transcription regulator Yin-yang 1: from silence to cancer*. *Crit Rev Oncog*, 2011. **16**(3-4): p. 227-38.
13. Deng, Z., et al., *Yin Yang 1: a multifaceted protein beyond a transcription factor*. *Transcription*, 2010. **1**(2): p. 81-4.
14. Fang, X., et al., *Switch to full-length of XAF1 mRNA expression in prostate cancer cells by the DNA methylation inhibitor*. *Int J Cancer*, 2006. **118**(10): p. 2485-9.
15. Lunardi, A., et al., *A co-clinical approach identifies mechanisms and potential therapies for androgen deprivation resistance in prostate cancer*. *Nat Genet*, 2013. **45**(7): p. 747-55.
16. Dobo, J., et al., *Cytokine response modifier a inhibition of initiator caspases results in covalent complex formation and dissociation of the caspase tetramer*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(50): p. 38781-90.
17. Guicciardi, M.E. and G.J. Gores, *Life and death by death receptors*. *FASEB J*, 2009. **23**(6): p. 1625-37.
18. Shamas-Din, A., et al., *Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013. **5**(4): p. a008714.
19. Srinivasula, S.M. and J.D. Ashwell, *IAPs: what's in a name?* *Mol Cell*, 2008. **30**(2): p. 123-35.
20. Kempkensteffen, C., et al., *[Expression levels of the IAP antagonists XAF1, Smac/DIABLO and HtrA2 in testicular germ cell tumours]*. *Aktuelle Urol*, 2008. **39**(6): p. 436-41.

21. Shibata, T., et al., *Disturbed XIAP and XAF1 expression balance is an independent prognostic factor in gastric adenocarcinomas*. *Ann Surg Oncol*, 2008. **15**(12): p. 3579-87.
22. Fong, W.G., et al., *Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines*. *Genomics*, 2000. **70**(1): p. 113-22.
23. Arora, V., et al., *Degradation of survivin by the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-XAF1 complex*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(36): p. 26202-9.
24. Chung, S.K., et al., *Frequent alteration of XAF1 in human colorectal cancers: implication for tumor cell resistance to apoptotic stresses*. *Gastroenterology*, 2007. **132**(7): p. 2459-77.
25. Shibata, T., et al., *Disturbed expression of the apoptosis regulators XIAP, XAF1, and Smac/DIABLO in gastric adenocarcinomas*. *Diagn Mol Pathol*, 2007. **16**(1): p. 1-8.
26. Chen, X.Y., Q.Y. He, and M.Z. Guo, *XAF1 is frequently methylated in human esophageal cancer*. *World J Gastroenterol*, 2012. **18**(22): p. 2844-9.
27. Straszewski-Chavez, S.L., et al., *XAF1 mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and X-linked inhibitor of apoptosis cleavage by acting through the mitochondrial pathway*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(17): p. 13059-72.
28. Tu, S.P., et al., *Tumor suppressor XIAP-Associated factor 1 (XAF1) cooperates with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand to suppress colon cancer growth and trigger tumor regression*. *Cancer*, 2010. **116**(5): p. 1252-63.
29. Guan, X.Y., et al., *Evidence for another tumor suppressor gene at 17p13.3 distal to TP53 in hepatocellular carcinoma*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2003. **140**(1): p. 45-8.
30. Ryland, G.L., et al., *Loss of heterozygosity: what is it good for?* *BMC Med Genomics*, 2015. **8**: p. 45.
31. Zou, B., et al., *Correlation between the single-site CpG methylation and expression silencing of the XAF1 gene in human gastric and colon cancers*. *Gastroenterology*, 2006. **131**(6): p. 1835-43.
32. Szyf, M., *DNA methylation and demethylation probed by small molecules*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1799**(10-12): p. 750-9.
33. Lee, M.G., et al., *Promoter CpG hypermethylation and downregulation of XAF1 expression in human urogenital malignancies: implication for attenuated p53 response to apoptotic stresses*. *Oncogene*, 2006. **25**(42): p. 5807-22.
34. Jang, J.Y., et al., *[Frequent epigenetic inactivation of XAF1 by promotor hypermethylation in human colon cancers]*. *Korean J Gastroenterol*, 2005. **45**(4): p. 285-93.
35. Victoria-Acosta, G., et al., *Epigenetic silencing of the XAF1 gene is mediated by the loss of CTCF binding*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 14838.
36. Wang, W., et al., *Transcriptional Regulation of Antiviral Interferon-Stimulated Genes*. *Trends Microbiol*, 2017. **25**(7): p. 573-584.
37. Leaman, D.W., et al., *Identification of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 as an interferon-stimulated gene that augments TRAIL Apo2L-induced apoptosis*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(32): p. 28504-11.
38. Zhang, X.N., et al., *Hyper-activated IRF-1 and STAT1 contribute to enhanced interferon stimulated gene (ISG) expression by interferon alpha and gamma co-treatment in human hepatoma cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1759**(8-9): p. 417-25.
39. Wang, J., et al., *c-Jun N-terminal kinase (JNK1) upregulates XIAP-associated factor 1 (XAF1) through interferon regulatory factor 1 (IRF-1) in gastrointestinal cancer*. *Carcinogenesis*, 2009. **30**(2): p. 222-9.
40. Wang, J., et al., *HSF1 down-regulates XAF1 through transcriptional regulation*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(5): p. 2451-9.

41. Zhang, W., et al., *Identification of a functional p53 responsive element within the promoter of XAF1 gene in gastrointestinal cancer cells*. *Int J Oncol*, 2010. **36**(4): p. 1031-7.
42. Li, J., J. Labbadia, and R.I. Morimoto, *Rethinking HSF1 in Stress, Development, and Organismal Health*. *Trends Cell Biol*, 2017.
43. Li, T., et al., *[Expression of HSF1 and XAF1 in gastro-intestinal cancer]*. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2007. **27**(9): p. 1447-50.
44. Ruppert, J.M., et al., *The GLI-Kruppel family of human genes*. *Mol Cell Biol*, 1988. **8**(8): p. 3104-13.
45. Kashyap, V. and B. Bonavida, *Role of YY1 in the pathogenesis of prostate cancer and correlation with bioinformatic data sets of gene expression*. *Genes Cancer*, 2014. **5**(3-4): p. 71-83.
46. Piunti, A. and A. Shilatifard, *Epigenetic balance of gene expression by Polycomb and COMPASS families*. *Science*, 2016. **352**(6290): p. aad9780.
47. Pilarsky, C., et al., *Identification and validation of commonly overexpressed genes in solid tumors by comparison of microarray data*. *Neoplasia*, 2004. **6**(6): p. 744-50.
48. Seligson, D., et al., *Expression of transcription factor Yin Yang 1 in prostate cancer*. *Int J Oncol*, 2005. **27**(1): p. 131-41.
49. Zaravinos, A. and D.A. Spandidos, *Yin yang 1 expression in human tumors*. *Cell Cycle*, 2010. **9**(3): p. 512-22.
50. Resendiz-Martinez, J., et al., *Correlation of the expression of YY1 and Fas cell surface death receptor with apoptosis of peripheral blood mononuclear cells, and the development of multiple organ dysfunction in children with sepsis*. *Mol Med Rep*, 2017. **15**(5): p. 2433-2442.
51. Baritaki, S., et al., *Chemotherapeutic drugs sensitize cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis: up-regulation of DR5 and inhibition of Yin Yang 1*. *Mol Cancer Ther*, 2007. **6**(4): p. 1387-99.
52. Beagan, J.A., et al., *YY1 and CTCF orchestrate a 3D chromatin looping switch during early neural lineage commitment*. *Genome Res*, 2017. **27**(7): p. 1139-1152.
53. Kang, K., J.H. Chung, and J. Kim, *Evolutionary Conserved Motif Finder (ECMFinder) for genome-wide identification of clustered YY1- and CTCF-binding sites*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(6): p. 2003-13.
54. Wasserman, W.W. and A. Sandelin, *Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements*. *Nat Rev Genet*, 2004. **5**(4): p. 276-87.
55. Sandelin, A., et al., *JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(Database issue): p. D91-4.
56. Messeguer, X., et al., *PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches*. *Bioinformatics*, 2002. **18**(2): p. 333-4.
57. Kumar, V.L. and P.K. Majumder, *Prostate gland: structure, functions and regulation*. *Int Urol Nephrol*, 1995. **27**(3): p. 231-43.
58. Cuzick, J., et al., *Prevention and early detection of prostate cancer*. *Lancet Oncol*, 2014. **15**(11): p. e484-92.
59. Ohlmann, C.H., *[Patients with metastatic prostate cancer : Recommendations for primary hormonal or chemohormonal therapy]*. *Urologe A*, 2017.
60. Murphy, T.M., A.S. Perry, and M. Lawler, *The emergence of DNA methylation as a key modulator of aberrant cell death in prostate cancer*. *Endocr Relat Cancer*, 2008. **15**(1): p. 11-25.
61. Muller, P.A. and K.H. Vousden, *p53 mutations in cancer*. *Nat Cell Biol*, 2013. **15**(1): p. 2-8.

62. Rao, X., et al., *An improvement of the $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis*. *Biostat Bioinforma Biomath*, 2013. **3**(3): p. 71-85.
63. Consortium, E.P., *An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome*. *Nature*, 2012. **489**(7414): p. 57-74.
64. Ratajewski, M. and L. Pulaski, *YY1-dependent transcriptional regulation of the human GDAP1 gene*. *Genomics*, 2009. **94**(6): p. 407-13.
65. Yan, B., et al., *Transcriptional regulation of the human acid alpha-glucosidase gene. Identification of a repressor element and its transcription factors Hes-1 and YY1*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(3): p. 1789-93.
66. Riethoven, J.J., *Regulatory regions in DNA: promoters, enhancers, silencers, and insulators*. *Methods Mol Biol*, 2010. **674**: p. 33-42.
67. Gavrilov A¹, et al., *Chromosome conformation capture (from 3C to 5C) and its ChIP-based modification*. *Methods Mol Biol*. 2009;567:171-88. doi: 10.1007/978-1-60327-414-2_12.
68. Bumgarner R. *DNA microarrays: Types, Applications and their future*. *Current protocols in molecular biology* / edited by Frederick M Ausubel . [et al]. 2013;0 22:Unit-22.1. doi:10.1002/0471142727.mb2201s101.
69. Chen, Ni, and Qiao Zhou. "The Evolving Gleason Grading System." *Chinese Journal of Cancer Research* 28.1 (2016): 58–64. PMC. Web. 9 Jan. 2018.