



## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

### Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Análisis de la expresión de los genes *HES6*, *ZNF547* y *FAM222A* en el modelo de oncogénesis MCF10A ER-Src tras un insulto con triptolide

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Biól. Eduardo Calvario Carrillo

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Mario Enrique Zurita Ortega

[Instituto de Biotecnología UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Leonor Pérez Martínez

[Instituto de Biotecnología UNAM](#)

Dra. Denhi Schnabel Peraza

[Instituto de Biotecnología UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Octubre, 2020



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.

## **MIEMBROS DEL JURADO:**

**Presidente:** Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay

**Secretario:** Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes Hoy

**Vocal:** Dra. Hilda María Lomeli Buyoli

**Vocal:** Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz

**Vocal:** Dra. Rosa Estela Navarro González

## **AGRADECIMIENTOS TÉCNICOS Y FINANCIAMIENTO**

Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. Mario Enrique Zurita Ortega en el Laboratorio de Transcripción, Epigenética y Desarrollo, el cual pertenece al Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología-UNAM.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca No. 887616 otorgada para la realización de estudios de posgrado dentro del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM.

A la Dra. Leonor Pérez Martínez y la Dra. Denhi Schnabel Peraza por ser parte de mi comité tutorial.

Al M. en C. Andrés Martín Saralegui Amaro perteneciente al Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada por la obtención de fotografías en el microscopio confocal.

A la M. en C. Maritere Urióstegui Arcos por proporcionarme los resultados del transcriptoma y CHIP-seq de la línea celular MCF10A ER-Src, y por enseñarme todas las técnicas experimentales realizadas en este proyecto.

Al Lic. J. Antonio Bolaños Guillen por la ayuda con los trámites administrativos durante los estudios de la maestría.

A la Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay, la Dra. Elizabeth Lorraine Jaimes Hoy, la Dra. Hilda María Lomeli Buyoli, la Dra. Rosa Estela Navarro González, y al Dr. Mario Ernesto Cruz Muñoz (sinodales) por las correcciones y sugerencias que ayudaron a mejorar esta tesis de maestría.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A mis padres, a mis hermanos, a mis abuelos y al resto de mi familia por su cariño a lo largo de toda mi vida y el apoyo incondicional.

Al Dr. Mario Enrique Zurita Ortega por aceptarme en su grupo de investigación, por las clases recibidas y por enseñarme a realizar investigación de calidad.

A las Dra. Martha Vázquez, a la Dra. Viviana Valadez y a mis compañeros de laboratorio por sus consejos y aportaciones durante los seminarios de grupo.

A Maritere, Ximena, Samantha y Francisco Vera por su amistad, por su paciencia y por su apoyo emocional durante los estudios de maestría.

# ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL TRIPTOLIDE .....	3
FIGURA 2. T. WILFORDII HOOK .....	4
FIGURA 3. ARQUITECTURA DE TFIIH .....	5
FIGURA 4. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS MCF10A QUE CONTIENEN LA FUSIÓN DE ER-SRC AL SER TRATADAS CON TAMOXIFEN.....	8
FIGURA 5. PRINCIPALES COMPONENTES INVOLUCRADOS EN LA RETROALIMENTACIÓN POSITIVA PARA LA TRANSFORMACIÓN Y MANTENIMIENTO DEL FENOTIPO CANCEROSO DE LA LÍNEA CELULAR MCF10A ER-SRC.	9
FIGURA 6. A) VIABILIDAD DE CÉLULAS MCF10A ER-SRC TRATADAS CON TPL. B) NIVELES DE LA POL II MEDIDOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.. .....	11
FIGURA 7. RESULTADOS DEL TRANSCRIPTOMA DE CÉLULAS MCF10A ER-SRC TRATADAS POR CUATRO HORAS CON TPL 125 nM.....	12
FIGURA 8. ANÁLISIS ONTOLÓGICO DE GENES ASOCIADOS A CANCER CUYOS NIVELES DE TRANSCRITOS AUMENTAN EN EL RNA-SEQ DE CÉLULAS MCF10A ER-SRC TRATADAS CON TPL .....	13
FIGURA 9. DOMINIOS CONSERVADOS DE LOS FACTORES HES 1-7 .....	15
FIGURA 10. NIVELES DE ARN MENSAJERO DE HES6 EN LA LÍNEA CELULAR MCF10A ER-SRC. ....	17
FIGURA 11. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS DOMINIOS Y MOTIVOS CONSERVADOS DENTRO DE LA SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE ZNF547. ....	19
FIGURA 12. NIVELES DE ARN MENSAJERO DE ZNF547 EN LA LÍNEA CELULAR MCF10A ER-SRC. ....	20
FIGURA 13. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA REGIÓN QUE INTERACTÚA CON LOS PÉPTIDOS B-AMILOIDES, .....	23
FIGURA 14. NIVELES DE ARN MENSAJERO DE FAM222A EN LA LÍNEA CELULAR MCF10A ER-SRC . ....	24
FIGURA 15. GEL DE AGAROSA AL 2% CON LOS RESULTADOS DE LA PCR DE LOS TRATAMIENTOS CON TPL=TRIPTOLIDE (125 nM POR CUATRO HORAS) EN CÉLULAS MCF10A ER-SRC.....	35
FIGURA 16. GEL DE AGAROSA AL 2% CON LOS RESULTADOS DE LA PCR DE LOS TRATAMIENTOS CON TPL=TRIPTOLIDE (125 mM POR CUATRO HORAS) EN CÉLULAS MCF7 Y MDA-MB-231.. .....	36
FIGURA 17. RESULTADOS DE WESTERN BLOT DE FAM222A EN CÉLULAS MCF10A ER-SRC.....	37
FIGURA 18. RESULTADOS DE INMUNOFLUORESCENCIAS PARA FAM222A NT.....	38
FIGURA 19. RESULTADOS DE INMUNOFLUORESCENCIAS PARA FAM222A TAM.....	39
FIGURA 20. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE LAS SECUENCIAS DE ESPECIES MODELO Y LA PROTEÍNA HUMANA FAM222A. ....	42
FIGURA 21. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS MOTIVOS ENCONTRADOS USANDO LA HERRAMIENTA MEME SUITE Y SU LOCALIZACIÓN. ....	43
FIGURA 22. GRAFICAS DE PASTEL REPRESENTADO LOS RESULTADOS OBTENIDOS MEDIANTE LA HERRAMIENTA PROTPARAM. ....	45
FIGURA 23. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DONDE SE MUESTRAN REGIONES CONSERVADAS DE LA PROTEÍNA FAM222A DE MAMÍFEROS.....	46
FIGURA 24. PREDICCIÓN DE REGIONES INTRÍNSECAMENTE DESORDENADAS DENTRO DE LA SECUENCIA DE LA PROTEÍNA HUMANA FAM222A.....	47

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PROTEÍNAS CON LAS CUALES EL TPL INTERACCIONA DIRECTAMENTE .....	6
TABLA 2. FUNCIONES GENERALES DE MIEMBROS DE LA FAMILIA HES .....	14
TABLA 3. PROTEÍNAS QUE INTERACCIONAN CON FAM222A. ....	22
TABLA 4. OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN LA PCR PARA LOS GENES DE INTERÉS. ....	29
TABLA 5. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS PRIMARIOS. ....	31
TABLA 6. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS SECUNDARIOS.....	31
TABLA 7. ANTICUERPOS UTILIZADOS PARA LA INMUNOFLUORESCENCIA DOBLE.....	32
TABLA 8. GENES ORTÓLOGOS DE FAM2222 CUYA SECUENCIA HA SIDO REVISADA O CURADA EN NCBI.....	40
TABLA 9. LOGOS GENERADOS MEDIANTE LA HERRAMIENTA MEME SUITE. ....	41

# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1 TRIPTOLIDE .....	3
1.1.1 <i>Actividad farmacológica</i> .....	4
1.1.2 <i>Blancos del TPL</i> .....	5
1.2 LINEAS CELULARES .....	7
1.2.1 <i>Células MCF10A ER-Src</i> .....	7
1.2.2 <i>Células MCF7 y MDA-MB-231</i> .....	10
2. ANTECEDENTES .....	11
2.1 FAMILIA DE GENES HES .....	14
2.1.1 <i>Gen HES6</i> .....	15
2.1.2 <i>Expresión de HES6</i> .....	16
2.2 GENES ZINC FINGER C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> .....	18
2.2.1 <i>Gen ZNF547</i> .....	18
2.2.2 <i>Expresión de ZNF547</i> .....	19
2.3 FAMILIA DE GENES FAM222 .....	20
2.3.1 <i>Gen FAM222A</i> .....	21
2.3.2 <i>Expresión de FAM222A</i> .....	23
3. JUSTIFICACIÓN .....	25
4. HIPÓTESIS .....	25
5. OBJETIVOS .....	25



5.1 Objetivo general.....	25
5.2 Objetivos específicos.....	26
<b>6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>26</b>
6.1 Corroborar la expresión a nivel de ARN mensajero de <i>HES6</i> , <i>ZNF547</i> y <i>FAM222A</i> en células MCF10A ER-Src, MCF7 y MDA-MB-231 con y sin TPL.....	26
6.2 Analizar la expresión de la proteína codificada por <i>FAM222A</i> y su localización subcelular en células MCF10A ER-Src con y sin TPL.....	26
6.3 Analizar la secuencia de la proteína FAM222A mediante herramientas bioinformáticas.....	27
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
7.1 ANALISIS EXPERIMENTAL.....	27
7.1.1 <i>Cultivo celular</i> .....	27
7.1.2 <i>Tratamiento con TPL</i> .....	28
7.1.3 <i>Obtención de ARN y síntesis de cADN</i> .....	28
7.1.4 <i>Análisis por RT-PCR semicuantitativo</i> .....	28
7.1.5 <i>Extractos totales</i> .....	30
7.1.6 <i>Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)</i> .....	30
7.1.7 <i>Ensayo de Western Blot</i> .....	30
7.1.8 <i>Ensayo de inmunofluorescencia doble</i> .....	32
7.2 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	33
7.2.1 <i>Búsqueda de ortólogos</i> .....	33
7.2.2 <i>Búsqueda de motivos</i> .....	33

7.2.3 <i>Análisis de la composición de aminoácidos y predicción de regiones intrínsecamente desordenadas</i> .....	34
<b>8. RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
<b>8.1 ANALISIS EXPERIMENTAL</b> .....	<b>35</b>
8.1.1 <i>Los niveles de ARN mensajero de HES6, ZNF547 y FAM222A aumentan con TPL en células MC10A ER-Src</i> .....	35
8.1.2 <i>Expresión de la proteína FAM222A en células MCF10A ER-Src no tratadas y tratadas con TPL</i> .....	36
8.1.3 <i>El tratamiento con TPL induce la formación de gránulos de FAM222A en el núcleo de células MCF10A ER-Src</i> .....	37
<b>8.2 ANALISIS BIOINFORMATICO</b> .....	<b>40</b>
8.2.1 <i>FAM222A está conservada en vertebrados</i> .....	40
8.2.2 <i>Regiones y motivos conservados en la proteína FAM222A</i> .....	40
8.2.3 <i>En mamíferos, la proteína FAM222A es rica en alaninas y prolinas</i> .....	44
8.2.4 <i>La proteína FAM222A humana posee varias regiones intrínsecamente desordenadas</i> .....	46
<b>9. DISCUSIÓN</b> .....	<b>48</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b> .....	<b>53</b>
<b>11. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>54</b>
<b>12. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>55</b>
<b>13. APÉNDICE</b> .....	<b>66</b>
13.1 <i>Componentes del medio de crecimiento para la línea celular MCF10A ER-Src</i> ...	66
13.2 <i>Lista de ortólogos del gen y la proteína FAM222A encontrados en la base de datos de NCBI y OrthoDB</i> .....	67

<b>13.3 Secuencias en formato FASTA obtenidas de NCBI y utilizadas para realizar los alineamientos múltiples. ....</b>	<b>77</b>
<b>13.4 Composición detallada de aminoácidos de ortólogos de la proteína FAM222A .</b>	<b>79</b>
<b>13.5 Predicción de desorden de cada uno de los aminoácidos que componen la secuencia de la proteína humana FAM222A.....</b>	<b>80</b>

## RESUMEN

Recientemente un análisis del transcriptoma en el modelo de oncogénesis MCF10A ER-Src reveló el aumento inesperado de la expresión de un grupo de genes cuando células en cultivo son tratadas con triptolide (inhibidor de la subunidad XPB que forma parte del factor general de transcripción TFIIH). En este proyecto se seleccionaron a los genes *HES6*, *ZNF547* y *FAM222A* para su estudio por pertenecer a este grupo. *HES6* y *ZNF547* fueron elegidos por ser genes que codifican para proteínas nucleares involucradas en la regulación transcripcional y por no tener reportes sobre su función en alguna respuesta celular a fármacos. Por otro lado, el gen *FAM222A* fue elegido particularmente porque la proteína para la cual codifica esta pobremente estudiada y su función es desconocida.

El objetivo principal de este proyecto fue analizar de manera experimental si la expresión de los tres genes aumentaba en el modelo de oncogénesis MCF10A ER-Src y adicionalmente, en dos líneas celulares pertenecientes al mismo linaje mamario (MCF7 y MDA-MB-231) cuando son tratadas con triptolide. También se determinó la localización subcelular de la proteína *FAM222A* y se realizaron varios análisis bioinformáticos sencillos para explorar características putativas sobre esta. Los resultados mostraron un aumento en la expresión de los tres genes en células de la línea celular MCF10A ER-Src con el tratamiento. Se observó también un aumento en la expresión del gen *FAM222A* en la línea MDA-MB-231 tratada con triptolide, pero, no se observaron cambios significativos en la expresión en células MCF7. De la misma forma, no se observaron cambios aparentes en la expresión de los genes *HES6* y *ZNF547* en estas dos líneas celulares en respuesta al triptolide. En cuanto a la expresión de la proteína *FAM222A*, hubo un ligero aumento en células MCF10A ER-Src tras el insulto con triptolide. La localización de esta proteína fue preferencialmente nuclear en células no tratadas y tratadas con triptolide. Inesperadamente, este fármaco indujo la formación de gránulos de mayor tamaño de *FAM222A* dentro del núcleo celular. Por otro lado, el análisis bioinformático reveló que la proteína *FAM222A* se encuentra presente en vertebrados, específicamente en la familia Gnathostomata y, además, la proteína para la cual codifica

podría contener seis nuevos posibles motivos con función biológica. Se realizó también un análisis bioinformático de los aminoácidos más abundantes dentro de la secuencia de la proteína FAM222A. Los resultados revelaron que, en mamíferos, esta proteína es rica en alaninas y prolinas. Además, se identificó una región de 152 aminoácidos rica en prolinas. Con base en estos resultados, se realizó también la predicción de regiones desestructuradas. Los resultados mencionados anteriormente coinciden con los datos recientemente publicados en los cuales se observa que la proteína FAM222A es una proteína intrínsecamente desordenada, lo que sugiere que esta proteína podría tener múltiples funciones dependiendo de su conformación, interacción con otras proteínas y el contexto celular.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 TRIPTOLIDE

El triptolide (TPL) es un diterpeno triepóxido insoluble en solventes acuosos (figura 1) cuya fórmula química es  $C_{20}H_{24}O_6$  y de peso molecular correspondiente a 360.404 g/mol (Xiu y Liu, 2018).

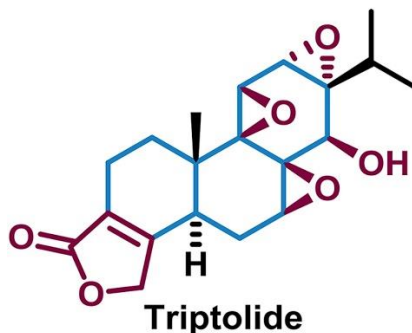


Figura 1. Estructura química del triptolide (Tomado de Hou *et al.*, 2019).

Es un metabolito secundario exclusivo de plantas del género *Tripterygium* perteneciente a la familia Celastraceae (Su *et al.*, 2018), cuya distribución geográfica abarca el este y sur de Asia. Al menos tres especies representativas de este género son encontradas en China: *Tripterygium hypoglaucum*, *Tripterygium regelii* y *Tripterygium wilfordii* (Ma *et al.*, 2017). Esta última es una planta leñosa perenne (figura 2) de la cual se han aislado más de 500 compuestos incluyendo terpenos (sesquiterpenoides, monoterpenos, diterpenos, triterpenos), flavonoides, lignanos, etc. (Lv *et al.*, 2019). De todos ellos, el compuesto más estudiado ha sido el TPL, el cual es abundante en las raíces leñosas principalmente, y es biosintetizado por diferentes diterpeno sintasas dentro de los plástidos a partir del precursor (E, E, E) – geranilgeranil difosfato (Su *et al.*, 2018).



Figura 2. *T. wilfordii* Hook (雷公藤, lei gong; vid trueno de Dios; tomado de Helmstäter, 2013).

### **1.1.1 Actividad farmacológica**

No hay estudios concretos de la actividad biológica específica del TPL en plantas del género *Tripterygium*, sin embargo, investigaciones con otros terpenoides similares sugieren que podría funcionar como primera línea de defensa contra bacterias y hongos patógenos que intentan penetrar en las raíces (Lange *et al.*, 2017).

En la medicina tradicional China, los extractos crudos de la raíz de plantas del género *Tripterygium* han sido utilizados desde el siglo XV contra la fiebre y enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide. Sin embargo, esta información no fue conocida por la ciencia occidental hasta finales del siglo XX. En 1970, investigadores descubrieron que especies de la familia Celastraceae tenían un efecto antineoplásico en pacientes con leucemia, usando principalmente extractos de *T. wilfordii* (Helmstäter, 2013).

Posteriormente, se analizaron los componentes de dichos extractos y se descubrió que el TPL era el componente principal, siendo aislado y caracterizado estructuralmente por primera vez en 1972 por Kupchan y colaboradores. A partir de entonces, numerosos estudios han demostrado que es capaz de inhibir la proliferación de al menos 60 líneas celulares cancerosas a concentraciones nanomolares y proponiéndolo como un

poderoso agente anticanceroso (Huang *et al.*, 2012; Lv *et al.*, 2019). Otros posibles usos farmacológicos del TPL incluyen el tratamiento contra enfermedades autoinmunes e inflamatorias como la psoriasis y artritis reumatoide (Han *et al.*, 2012; Ziaei y Halaby, 2016) ), y contra enfermedades neurodegenerativas que incluyen el Alzheimer (Wang *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2012).

### 1.1.2 Blancos del TPL

TFIIH (Factor de transcripción II H) es un complejo proteico conservado en la evolución desde levaduras hasta humanos, y está formado por 10 subunidades, siete de las cuales forman el núcleo (*Core*): XPB, XPD, P62, P52, P44, P34 y P8 (figura 3); y las otras tres conforman el CAK (*cyclin activating kinase-subcomplex*): MAT1, Cdk7 y Ciclina H (Rimel y Taatjes, 2018).

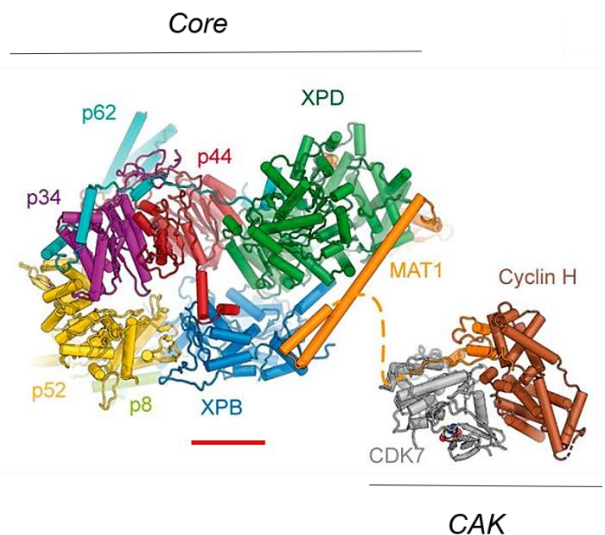


Figura 3. Arquitectura de TFIIH (Greber *et al.*, 2020).

Ambos subcomplejos tienen funciones celulares importantes de manera independiente: el subcomplejo *core* participa en la reparación por escisión de nucleótidos (NER; Lainé y Egly, 2006), y el subcomplejo CAK está involucrado en la regulación del ciclo celular, específicamente en la transición de la fase G2 a M (Fisher, 2005). Cuando los dos subcomplejos forman a TFIIH, hacen que este factor de transcripción sea clave en la



transcripción mediada por la ARN polimerasa II (Pol II; Yan *et al.*, 2019). Esto es respaldado por el hecho de que una vez que se reclutan los factores generales de transcripción, la subunidad XPB de TFIIH promueve la apertura de ADN (Ácido Desoxirribonucleico), y CDK7 fosforila a la serina 5 (Ser5) y la serina 7 (Ser7) del CTD (*C-terminal domain*) de la Pol II para que se lleve a cabo la elongación de la transcripción (Compe y Egly, 2016).

Desde el 2011, se sabe que el blanco principal del TPL es XPB uniéndose covalentemente a la cisteína 342 (Cys342; He *et al.*, 2015), inhibiendo su actividad ATPasa, el mecanismo de NER y la transcripción dependiente de la Pol II (Titov *et al.*, 2011). A su vez, esto desencadena mecanismos de respuesta complejas como inducción de apoptosis, inhibición del ciclo celular, inducción de autofagia, disminución de la vascularización y supresión de migración celular (Yan y Sun, 2018; Wei *et al.*, 2019).

Se ha reportado también que otras cinco proteínas interactúan directamente con el TPL (tabla 1). Sin embargo, los detalles bioquímicos de las interacciones con estas proteínas no están bien caracterizados como los de XPB, por lo que se necesitan mayores estudios para detallar los mecanismos moleculares y celulares involucrados.

*Tabla 1.* Proteínas con las cuales el TPL interactúa directamente (Noel *et al.*, 2019).

Nombre de la proteína	Método de validación de la interacción	Referencia
ADAM10 ( <i>a disintegrin and metalloproteinase 10</i> )	Cromatografía de afinidad y espectrometría de masas.	Soundararajan <i>et al.</i> , 2009
DCTPP1 ( <i>dCTP pyrophosphatase 1</i> )	Ensayos de <i>pull-down</i> .	Corson <i>et al.</i> , 2011
ER $\alpha$ ( <i>estrogen receptor alpha</i> )	Predicción computacional, resonancia de plasmones superficiales, calorimetría de titulación isotérmica y ensayos con genes reportero.	Liu <i>et al.</i> , 2015

PC2 ( <i>polycystin-2</i> )	Fraccionamiento de proteínas cromatográficas, análisis MALDI-MS e inmunotransferencia.	Leuenroth <i>et al.</i> , 2007
TAB1 ( <i>TGF-beta-activated kinase-1 binding protein 1</i> )	Ensayos de <i>pull-down</i> .	Lu <i>et al.</i> , 2014
XPB ( <i>xeroderma pigmentosum group B</i> )	Inmunoprecipitación e <i>inmunoblotting</i> . Ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . El triptolide en <i>Drosophila</i> fenocopia mutaciones en TFIIH.	Titov <i>et al.</i> , 2011 Villicaña <i>et al.</i> , 2013

## 1.2 LINEAS CELULARES

En los últimos años, el uso de líneas celulares ha sido una herramienta muy útil para estudiar los blancos de una gran cantidad de fármacos antineoplásicos y, sobre todo, la respuesta celular que desencadenan. Actualmente, en el laboratorio del Dr. Mario Zurita se investigan los efectos del TPL y los mecanismos moleculares involucrados utilizando principalmente a la línea celular MCF10A ER-Src, y adicionalmente a las líneas de cáncer de mama MCF7 y MDA-MB-231.

### 1.2.1 Células MCF10A ER-Src

Esta línea celular es derivada de las células parentales MCF10A, la cual es una línea celular epitelial inmortalizada no cancerosa derivada del tejido mamario fibroquístico obtenido de una mastectomía de una mujer de 36 años sin antecedentes familiares de cáncer de mama y sin evidencia de enfermedad. Esta línea se caracteriza por ser negativa para el receptor de estrógeno (ER), no ser completamente diploide y ser citogenéticamente anormal (Soule *et al.*, 1990), teniendo una delección en el cromosoma 9p21. Esta delección incluye parte del locus de *INK4/ARF*, por lo que estas células carecen de los genes que codifican para los inhibidores de cinasas dependientes de ciclina p15<sup>INK4B</sup> y p16<sup>INK4A</sup> (Cowell *et al.*, 2005), además de presentar la amplificación de *MYC* (Debnath *et al.*, 2003).

Las células MCF10A ER-Src contienen un gen exógeno que codifica ER-Src, una proteína que contiene el dominio de unión a ligando del receptor de estrógeno (ER) fusionado a la región carboxilo terminal de la cinasa Src (v-Src). Cuando estas células son tratadas con tamoxifen, se desencadena la activación transitoria de Src a las 36 horas post-tratamiento (figura 4), lo que posteriormente induce la adquisición de un fenotipo canceroso (transformación) y la capacidad de formación de mamosferas, así como la habilidad de formar colonias en agar suave, el incremento de la motilidad, adquisición de la capacidad de invasión y la formación de tumores en ratones (Iliopoulos *et al.*, 2009).

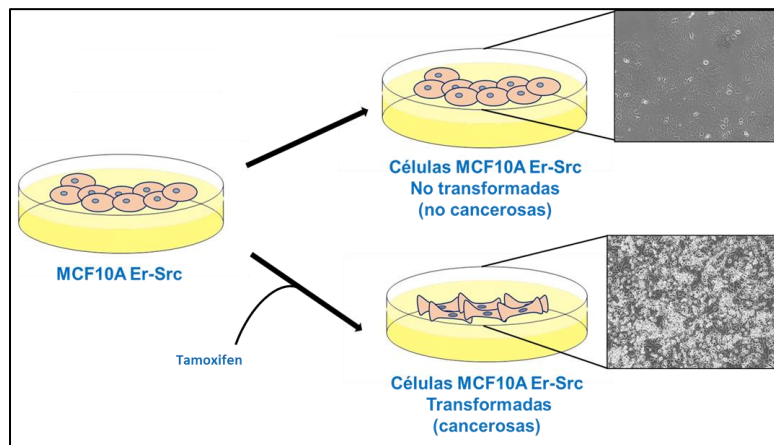


Figura 4. Transformación de células MCF10A que contienen la fusión de ER-Src al ser tratadas con tamoxifen, induciendo la activación de Src. Las microfotografías revelan los cambios en la morfología celular una vez que las células han sido transformadas.

La forma en la que el tamoxifen induce el fenotipo canceroso en células MCF10A ER-Src (figura 5) es uniéndose directamente al dominio de unión a ligando de ER produciendo un cambio conformacional seguido de la autofosforilación de la tirosina 416 (Tyr 416; Endo *et al.* 2017). Este evento desencadena indirectamente la fosforilación de residuos de serina del inhibidor de NFκB (IκB). Una vez que el inhibidor está fosforilado, se libera el factor NFκB y el inhibidor IκB se degrada vía proteosoma, el factor NFκB se transloca al núcleo, y activa la expresión de la interleucina 6 (IL-6). Después la proteína se libera y se une a su receptor (IL6-R). Cuando esta citocina se une a su receptor de

membrana, induce la dimerización y activa a las quinasas JACKs, las cuales se autofosforilan y fosforilan también al receptor. Los sitios fosforilados funcionan como sitio de anclaje para las proteínas STATs que contienen dominios SH2 (Src homology 2), en este caso STAT3. Cuando se recluta hacia el receptor, las STAT3 se fosforilan, dimerizan y se translocan al núcleo para regular la transcripción de genes asociados con proliferación celular y anti-apoptosis (STAT3 fosforilado es importante para el mantenimiento de la transformación celular y es usado como control de transformación). De manera paralela la activación del receptor de la IL-6 promueve el reclutamiento de la fosfatasa de tirosina SHP-2 a través de su dominio SH2, para fosforilar residuos de tirosina de proteínas adaptadoras como la Grb2, la cual activa a RAS y de ahí las cinasas correspondientes rio abajo Raf/MEK/Erk, repitiéndose la fosforilación del inhibidor de NFκB y la transcripción constitutiva del factor transcripcional STAT3 (Fleming *et al.*, 2015).

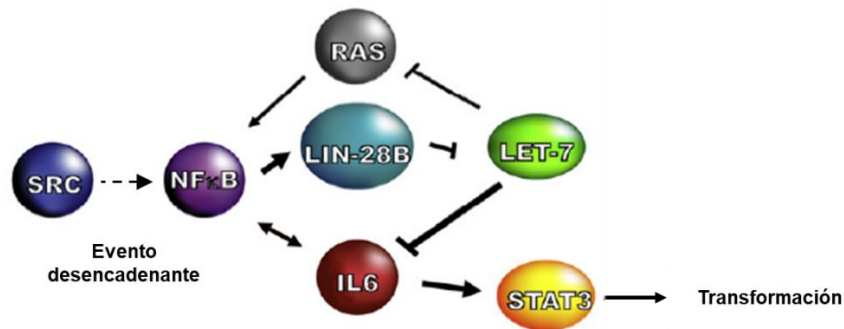


Figura 5. Principales componentes involucrados en la retroalimentación positiva para la transformación y mantenimiento del fenotipo canceroso de la línea celular MCF10A ER-Src (Modificado de Iliopoulos *et al.*, 2009).

De esta manera, este modelo de oncogénesis puede usarse para investigar mecanismos bioquímicos de transformación oncogénica y recientemente, para estudiar la respuesta diferencial ante diversos fármacos entre células con fenotipo no canceroso (No transformadas= NT) y canceroso (Transformadas= TAM).

### **1.2.2 Células MCF7 y MDA- MB-231**

MCF7 (siglas provenientes de *Michigan Cancer Foundation*) es una línea celular epitelial de cáncer de mama. Fue obtenida de un adenocarcinoma de una paciente de 69 años y su principal característica es ser positiva para el receptor de estrógeno (ER) y para el receptor de progesterona (PR), perteneciendo al subtipo luminal A. Esta línea celular, además, es considerada como pobremente agresiva y no invasiva, teniendo un bajo potencial metastásico (Comşa *et al.*, 2015).

Por otro lado, MDA-MB-231 es una línea celular epitelial de mama cancerosa que fue establecida a partir de una efusión pleural de una mujer caucásica de 51 años con adenocarcinoma mamario. Estas células se caracterizan por ser altamente agresivas e invasivas, pobremente diferenciadas y triple negativas, es decir, no expresan ER, ni PR, y tampoco al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2; Dai *et al.*, 2017).

Tanto las células MCF7 como MDA-MB-231, son comúnmente utilizadas en laboratorios de investigación para estudiar la biología del cáncer de mama. Debido a esto, también son usadas en el desarrollo de nuevas drogas antineoplásicas y para entender la resistencia a tratamientos quimioterapéuticos.

## 2. ANTECEDENTES

Recientemente en nuestro grupo de laboratorio, Urióstegui y colaboradores (2020) realizaron el análisis transcriptómico (RNA-seq enriquecido con Poli-A) de células NT y TAM, no tratadas y tratadas con TPL a 125 nM por cuatro horas, una concentración y tiempo en los cuales la viabilidad de células NT y TAM es del 90% y 80% respectivamente, y donde los niveles de la Pol II se reducen a la mitad (figura 6).

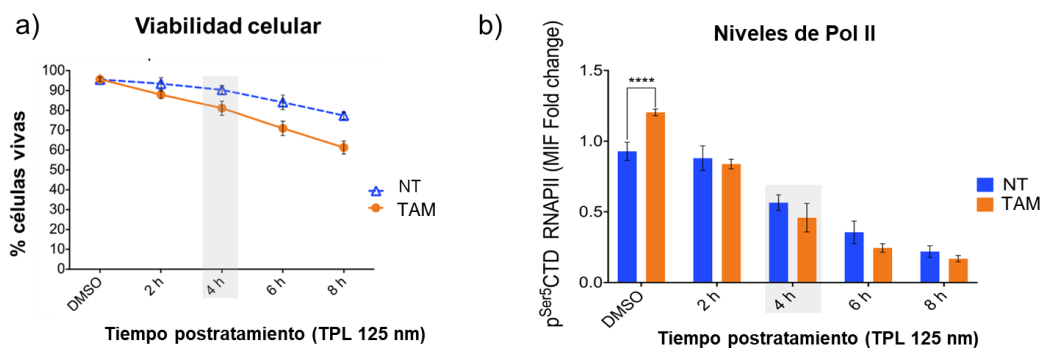


Figura 6. a) Viabilidad de células MCF10A ER-Src tratadas con TPL. b) Niveles de la Pol II medidos por citometría de flujo. Células no transformadas (NT; en color azul) y transformadas (TAM; en color naranja) durante dos, cuatro, seis y ocho horas incubadas con TPL a 125 nM, mientras que las células con DMSO (Dimetilsulfóxido/vehículo) fueron incubadas por ocho horas (Urióstegui *et al.*, 2020).

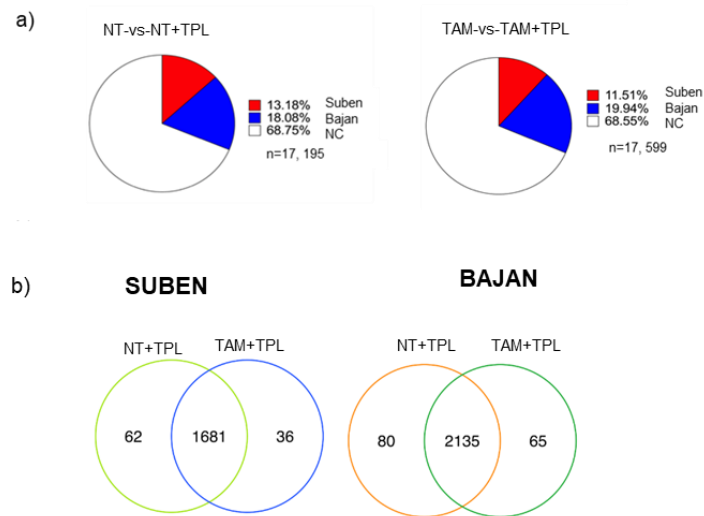
Adicionalmente, usando las mismas condiciones, realizaron la técnica de inmunoprecipitación de cromatina acoplada a la secuenciación masiva de ADN (ChIP-Seq) contra la Pol II para poder visualizar la localización de esta polimerasa en el genoma y evaluar el efecto del TPL sobre la transcripción.

De manera general, el transcriptoma reveló la expresión en promedio de 17 397 genes entre células NT y TAM, con y sin tratamiento. Además, se reveló la disminución global de la Pol II en los promotores tanto de células NT como TAM tratadas.

Debido a que el TPL inhibe globalmente la transcripción, fue inesperado observar que el 68 % de los genes no se veían afectados de forma significativa en su expresión cuando

células NT y TAM son tratadas. Adicionalmente, se observó la disminución en la expresión de 18.08% genes y el aumento de 13.18% en células NT cuando son tratadas con TPL.

Por otro lado, se observó la disminución de transcritos del 19.94% de genes, mientras que hubo un aumento en la expresión de 11.51 % genes en células TAM cuando son tratadas con TPL. El análisis también reveló que los niveles de transcritos de 2135 genes disminuyeron y los de 1681 genes aumentaron tanto en células NT y TAM tras el insulto (figura 7). Este último grupo de genes llamo la atención debido a que el aumento en los niveles de los transcritos por el tratamiento con TPL podría estar involucrado en alguna respuesta celular al insulto.



**Figura 7.** Resultados del transcriptoma de células MCF10A ER-Src tratadas por cuatro horas con TPL 125 nM (modificado de Urióstegui *et al.*, 2020). a) Gráficas de pastel mostrando el porcentaje de genes cuyos transcritos disminuyen (azul) y aumentan (rojo). En blanco representa el porcentaje de genes que no cambian su expresión tras el insulto (*Fold change*  $\log_2$  no significativo). b) Diagramas de Ven mostrando la cantidad de genes cuya expresión sube o baja en cada condición. NT= no transformadas, NT+TPL= no transformadas tratadas con triptolide, TAM= transformadas, TAM+TPL = transformadas con triptolide.

Por lo anterior, se realizó un análisis ontológico de genes involucrados en cáncer y cuyos niveles de transcritos aumentaban en el transcriptoma por el TPL. Los resultados mostraron que estos genes estaban asociados a diferentes procesos como quimioterapia, hipoxia y respuesta a daño del ADN (figura 8).

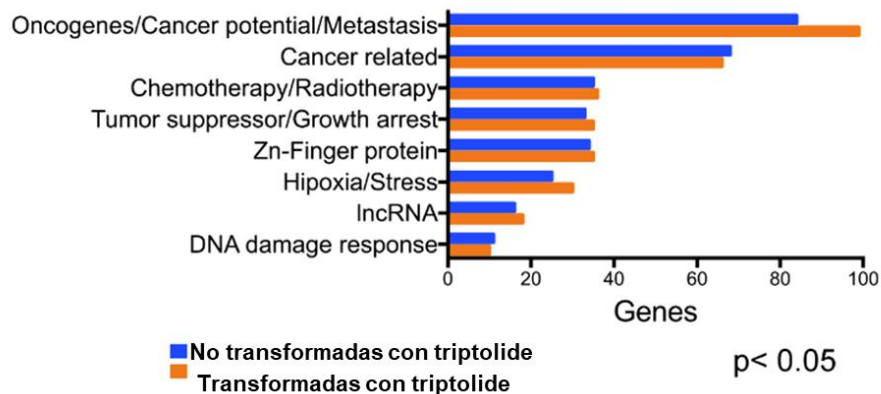


Figura 8. Análisis ontológico de genes asociados a cáncer cuyos niveles de transcritos aumentan en el RNA-seq de células MCF10A ER-Src tratadas con TPL .

Dicho análisis también reveló que estos genes pueden codificar para proteínas asociadas a metástasis y también para proteínas *Zinc Finger*. *HES6* y *ZNF547* son genes que pertenecen a estos dos grupos respectivamente y fueron seleccionados para ser estudiados en el proyecto de maestría porque codifican para proteínas nucleares que involucradas en regulación de transcripción (área de investigación del grupo del Dr. Mario Zurita) y porque principalmente no existen reportes sobre su función celular en respuesta a fármacos antineoplásicos como el TPL.

Por otra parte, *FAM222A* fue seleccionado particularmente por aumentar sus niveles de transcritos en respuesta a otros fármacos como JQ1 y cisplatino (Maeda *et al.*, 2014; Mio *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2020) y por codificar para una proteína de función desconocida.

A continuación, se describe la información de cada una de las familias en las que se encuentran clasificados los tres genes mencionados anteriormente, la características



particulares de cada uno de ellos y la información de las proteínas para las cuales codifican.

## 2.1 FAMILIA DE GENES *HES*

Los genes *HES* son los homólogos en mamíferos de los genes de *Drosophila* “hairy and Enhancer of split (Kageyama *et al.*,2007). Se han identificado siete genes *HES* en humanos y ratones, denominadas *Hes1–7* que codifican para los factores del mismo nombre (Sun *et al.*, 2007) y cuyas funciones se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Funciones generales de miembros de la familia *HES* (Kageyama *et al.*, 2007)

Miembro de la familia <i>HES</i>	Función general
HES 1	Represión de la neurogénesis (Vía dependiente e independiente de NOTCH)
HES 2	Función desconocida
HES 3	Represión de la neurogénesis (Vía de NOTCH)
HES4	Función desconocida
HES5	Represión de la neurogénesis (Vía de NOTCH)
HES6	Promoción de la neurogénesis y miogénesis (Reprime a la expresión de HES1)
HES7	Promoción de la somitogénesis (Vía de NOTCH)

Tres dominios conservados confieren funciones transcripcionales a todos los factores *HES*: los dominios bHLH, Orange y WRPW (figura 9). El dominio bHLH consta de dos regiones: la región básica para unión al ADN y la región hélice-bucle-hélice para la dimerización. A diferencia de la mayoría de los dominios bHLH de otras proteínas, el dominio bHLH de los factores *HES* tienen un residuo de prolina en el centro de la región básica. Se propone que esta prolina confiere a los factores *HES* una actividad de unión al ADN única. La mayoría de los factores bHLH se unen a una secuencia de consenso llamada caja E (E-box: CANNTG) que está presente en la región promotora de sus genes

diana. Sin embargo, los factores HES se unen con mayor afinidad a secuencias blanco-diferentes a otros factores bHLH. Estas secuencias se denominan sitios de clase C o caja N (N-box; CACNAG).

El dominio Orange tiene dos hélices anfipáticas y regula la selección de socios heterodímeros de bHLH. El dominio WRPW C-terminal, que consiste en el tetrapéptido WRPW, reprime la transcripción interactuando con el correpresor TLE (transducin-like enhancer of Split). Esta secuencia también actúa como una señal de poliubiquitinación, a través de la cual, los factores HES están poliubiquitinados y son degradados por el proteosoma, y por lo tanto tienen vidas medias muy cortas de ~ 20 minutos (Kageyama *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007).

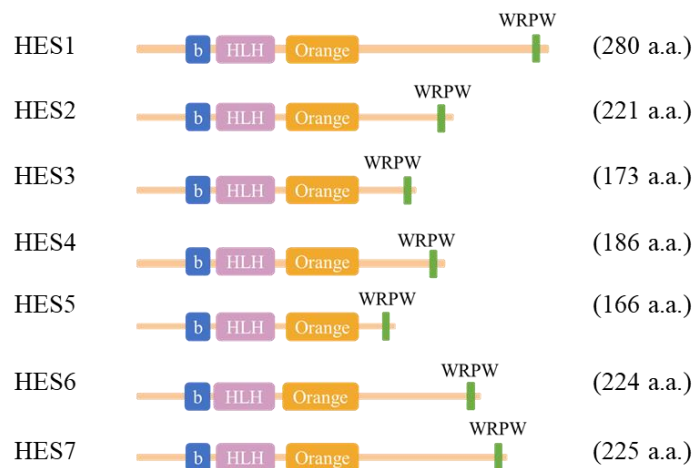


Figura 9. Dominios conservados de los factores HES 1-7 (Modificado de Sun *et al.*, 2007; Kageyama *et al.*, 2007)

### 2.1.1 Gen *HES6*

*HES6* es un gen de 2,396 pb (2.3 kb) localizado en el cromosoma 2 (239, 146, 908-239,149303; GRCH37/hg19:), y codifica al menos para nueve transcritos (Ensembl, 2020). Según el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, 2020), el gen *HES6* se encuentra conservado en el grupo de los vertebrados.

*HES6* codifica para un cofactor (*hairy and Enhancer of split 6*) que pertenece a la subfamilia de represores transcripcionales bHLH (*basic helix-loop-helix*) y que ha sido reportada en el núcleo, nucleolo, cuerpos nucleares y citoplasma (*The Human Protein Atlas*, 2020).

El dominio bHLH en *HES6* es más corto que el resto de los miembros de la familia *HES*, por lo cual no puede unirse a la caja N, es decir, no se une directamente al ADN (Gao *et al.*, 2001). Sin embargo, *HES6* heterodimeriza con *HES1* o con otras proteínas reguladas por NOTCH (Murai y Jones, 2011). También se ha reportado que la transcripción de *HES6* está directamente activada por el heterodímero CLOCK/BMAL1 (factores transcripcionales del ciclo circadiano), mostrando una expresión oscilatoria anti-fásica (Lee *et al.*, 2011), mientras que otros factores de la familia *HES* (*HES1* y *HES7*) han mostrado expresión oscilatoria con periodos de dos horas (Bessho *et al.*, 2001; Hirata *et al.*, 2002). La degradación de *HES6* es mediada por la sumoilación de la Lys27 y Lys30 promoviendo su ubiquitinación, y posterior degradación vía proteosoma 26S (Kang y Kim, 2005; Lee *et al.*, 2015).

La función de *HES6* es promover la diferenciación neuronal y miogénica (Nam *et al.*, 2015). Sin embargo, se encuentra sobre expresada en varios tipos de cáncer (carcinoma hepatocelular, cáncer de mama, glioma, neoplasia hematodérmica, cáncer colorrectal y de próstata). *HES6* está asociado con una pobre prognosis en pacientes con cáncer colorrectal al promover la migración e invasión de células cancerosas activando la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina (Xu *et al.*, 2018). En cáncer de próstata, la sobreexpresión induce la expresión de genes asociados con la migración celular como *MMP7*, *ITGB2*, *STEAP4* y *GNF11* (Carvalho *et al.*, 2015).

### **2.1.2 Expresión de *HES6***

En humanos, este gen se expresa principalmente en la glándula pituitaria, en el cerebro, testículos, colon y en el cérvix según la información depositada en la base de datos *The Genotype-Tissue Expression* (2020).

Resultados obtenidos en el transcriptoma de la línea celular MCF10A ER-Src realizado por Urióstegui y colaboradores (2020) muestran que cuando las células NT son tratadas con TPL se observa un aumento de 3.5 veces en la expresión del gen, mientras que células T aumentaron 2.8 veces la expresión de *HES6* tras recibir el insulto (Urióstegui *et al.*, 2020; en revisión; figura 10). Resultados similares han sido reportados en las líneas celulares de cáncer nasofaríngeo CNE2 y TWO3 tratadas con JQ1 (inhibidor del bromo dominio de las proteínas de la familia BET) a una concentración de 1  $\mu$ M por tres horas (Li *et al.*, 2018).

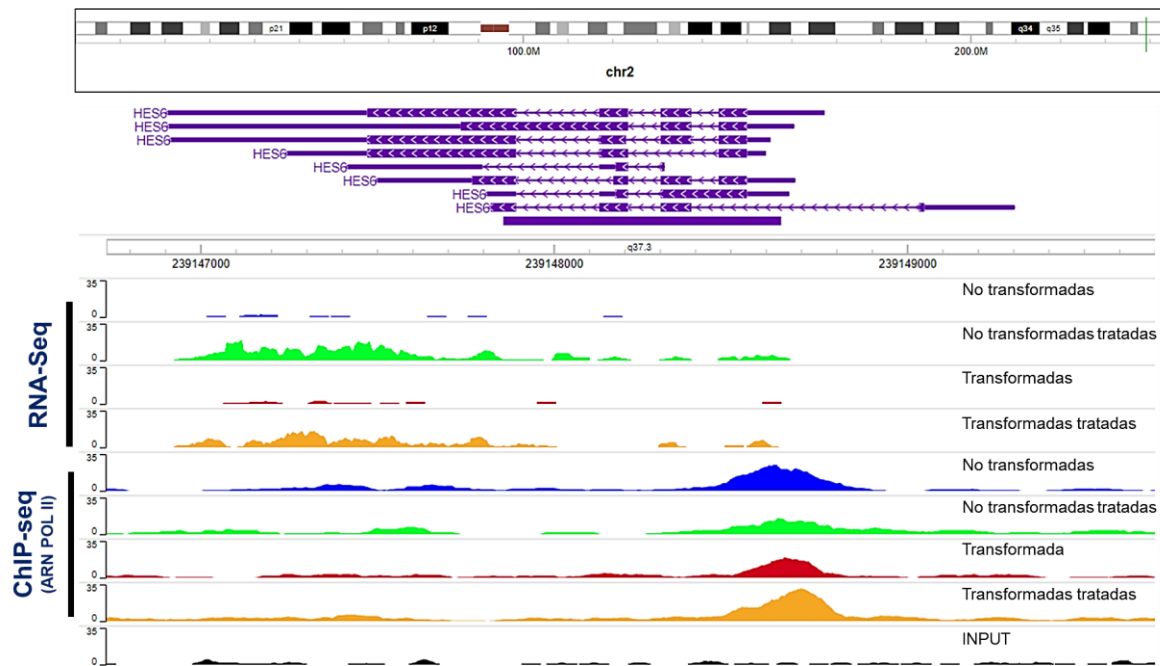


Figura 10. Niveles de ARN mensajero de *HES6* en la línea celular MCF10A ER-Src con DMSO (No transformadas y Transformadas), y con TPL a 125 nM por cuatro horas (No transformadas tratadas y *Transformadas* tratadas). Se muestran también los niveles de la ARN Pol II sobre el promotor de *HES6* (ChIP-seq) bajo las mismas condiciones antes mencionadas. En la parte superior se señala la posición de *HES6* dentro del cromosoma dos. Las figuras de color morado representan los transcritos anotados. Los datos se visualizaron usando el servidor WashU Epigenome Browser (<https://epigenomegateway.wustl.edu/>).

## 2.2 GENES ZINC FINGER C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>

Los genes Zinc Finger C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> o KRAB (ZNF-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) constituyen la clase más grande de factores de transcripción y una de las familias de genes más grandes en mamíferos (Tadepally *et al.*, 2008). La característica principal de estos genes es que contienen un exón que codifica para el dominio KRAB, y el exón final 3' codifica para varios motivos dedos de zinc (ZNF) del tipo C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (Cisteína-2-Histidina-2; Bruno *et al.* , 2019 ), donde los dos residuos de cisteína y dos de histidina coordinan un ión de zinc y doblan el motivo en una proyección parecida a un dedo que puede interactuar con el ADN (Urrutia, 2003).

El dominio KRAB de las proteínas con dedos de zinc ZNF, usualmente se encuentra localizado en el extremo N (amino) terminal y es considerado un dominio para la represión transcripcional. Además, se ha reportado que la actividad represora de KRAB esta mediada por el reclutamiento de KAP1 (*KRAB-associated protein*; también conocido como TRIM28 o tripartite motif protein 28), una proteína de andamiaje que recluta mediadores para la formación de heterocromatina. Es importante señalar que no todas la ZNF interactúan con KAP1 (Ecco *et al.*, 2017), pues pueden funcionar como activadores transcripcionales al interactuar con coactivadores como CBP, p300 y CEBP (Jen y Wang, 2016).

La función biológica reportada de las proteínas ZNF C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> es bastante diversa pues participan en numerosos procesos fisiológicos, incluida la proliferación celular, la diferenciación, el desarrollo, el metabolismo, la autofagia y la muerte celular por apoptosis, manteniendo así la homeostasis del tejido (Cassandri *et al.*, 2017; Jen y Wang, 2016).

### 2.2.1 Gen ZNF547

*ZNF547* es un gen que produce una proteína que pertenece a la familia de proteínas ZNF C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>. Se encuentra localizado en el cromosoma 19 (57,363, 477-67,379,564; GRCH37/hg19), tiene un tamaño de 16, 131 pb (16.13 Kb) y según NCBI (2020), se

encuentra conservado en mamíferos placentarios. El gen *ZNF547* contiene cuatro exones, uno de los cuales es compartido con el gen *TRAPPC2B* que codifica para la proteína de transporte vesicular *Trafficking Protein Particle Complex 2B* (Ensembl, 2020).

La proteína ZNF547 está conformada por una secuencia de 402 residuos de aminoácidos y tiene una masa molecular de 45.9 KDa. Dentro de la secuencia de ZNF547 (figura 11) se han encontrado diez motivos dedos de zinc C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> y un dominio KRAB de represión transcripcional (The Uniprot Consortium, 2020).

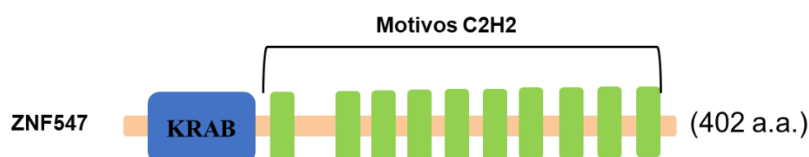


Figura 11. Representación gráfica de los dominios y motivos conservados dentro de la secuencia de aminoácidos de ZNF547.

### 2.2.2 Expresión de ZNF547

Se ha reportado que el gen *ZNF547* se expresa en diferentes tejidos en humanos, principalmente en el cerebro, la glándula pituitaria, los testículos, en el bazo y en la glándula tiroides según la información depositada en la base de datos *The Genotype-Tissue Expression* (2020).

Por otro lado, resultados recientes obtenidos en el transcriptoma de la línea celular MCF10A ER-Src realizado por Urióstegui y colaboradores (2020) muestran que cuando las células NT son tratadas con TPL se observa un aumento de 4.8 veces en la expresión, mientras que células TAM aumentaron 3.0 veces la expresión de *ZNF547* tras recibir el insulto (figura 12).



Figura 12. Niveles de ARN mensajero de *ZNF547* en la línea celular MCF10A ER-Src con DMSO (No transformadas y Transformadas) y con TPL a 125 nM por cuatro horas (No transformadas tratadas y Transformadas tratadas). Se muestran también los niveles de la ARN Pol II sobre el promotor de *ZNF547* y *TRAPPC2B* (ChIP-seq) bajo las mismas condiciones antes mencionadas. En la parte superior se señala la posición de *ZNF547* dentro del cromosoma 19. Las figuras de color morado representan los transcritos anotados de *ZNF547* y *TRAPPC2B*. Los datos se visualizaron usando el servidor WashU Epigenome Browser (<https://epigenomegateway.wustl.edu/>).

## 2.3 FAMILIA DE GENES FAM222

Según la nomenclatura establecida por la Organización del Genoma Humano (*Human Genome Organisation*; HUGO), cuando una serie de genes anónimos pueden estar relacionados por la similitud de sus secuencias, pero no se pueden describir por homología o función, se les asigna el símbolo anónimo y temporal FAM#. Estos genes se agrupan en familias cuyos miembros presentan una identidad mayor al 40% en la secuencia de aminoácidos de sus productos genéticos, aunque hay excepciones (Wain *et al.*, 2002). Siguiendo esta nomenclatura, la familia con similitud de secuencia 222 (FAM222) contiene a dos integrantes: el miembro A (*FAM222A*) ubicado dentro del cromosoma 12 (12q24.11) y el miembro B (*FAM222B*) ubicado dentro del cromosoma 17 (17q11.2).

### 2.3.1 Gen *FAM222A*

Información depositada en NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; Gene ID: 84915) señala que *FAM222A* tiene un tamaño de 56, 282 pares de bases (pb). Además, datos en Ensembl (2020) muestran que el gen codifica para tres transcritos, dos de los cuales son codificantes para la misma proteína.

Según *The UniProt Consortium* (2020) y NCBI (2020), el gen humano *FAM222A* codifica para la proteína del mismo nombre (antes llamada C12orf34) de 452 aminoácidos (46.7 KDa) mientras que el gen *FAM222B* codifica para la proteína de 564 aminoácidos (59.6 KDa), teniendo una identidad igual al 20.7%. Ambas proteínas han sido reportadas en el nucleoplasma en diferentes líneas celulares, sin embargo, también se ha encontrado que *FAM222A* se localiza en la membrana plasmática, sitios de adhesión focal y mitocondria (*The Human Protein Atlas*, 2020).

Se ha determinado que *FAM222A* no contiene dominios o motivos conocidos ni secuencias señal. Además, estudios bioquímicos han demostrado que esta proteína podría ser clasificada como intrínsecamente desordenada ya que se ha calculado que el 63.5% de su estructura no está plegada, y el resto solo contiene 2.63% de  $\alpha$ -hélices y 33.87% de hojas  $\beta$  (Yan *et al.*, 2020).

No se conoce la función de *FAM222A*, sin embargo, se sabe que interacciona físicamente con siete proteínas implicadas en la regulación transcripcional en el núcleo celular (Huttlin *et al.*, 2017) y cuyas características generales se describen en la tabla 3.



Tabla 3. Proteínas que interactúan con FAM222A.

Proteína	Función	Referencia
MAB21L1	Pertenece a la familia MAB21 implicada en los procesos de destino celular en metazoos. Posible nucleotidiltransferasa.	De Oliveira Mann <i>et al.</i> , 2016
NLK	Serina/treonina cinasa de la familia MAPK, importante para la proliferación celular, el desarrollo embrionario y el sistema nervioso en vertebrados. Interactúa y fosforila a varios factores de transcripción. Involucrada en la respuesta a daño al ADN, regulando la actividad y estabilidad de P53. No se sabe cuáles son los sitios blanco-específico de esta cinasa, sin embargo, se presume que pueden ser serinas (S) y treoninas (T) adyacentes a una prolina (SP o ST).	Huang <i>et al.</i> , 2015 Ishitani <i>et al.</i> , 2003 Ishitani e Ishitani., 2013 Zhang <i>et al.</i> , 2014
MEIS1 MEIS2 PBX1 PBX2 PBX3	Factores de transcripción que forman parte de la clase de proteínas TALE ( <i>Three amino acids loop extension</i> ). Son importantes para el desarrollo embrionario y la oncogénesis. Las proteínas MEIS y PBX pueden dimerizar y formar complejos ternarios con otros factores de transcripción. MEIS1 y PBX1 pueden inducir apoptosis, sin embargo, cuando HOXA9 se co-expresa y se une a MEIS1, este tiene un efecto antiapoptótico.	Wermuth y Buchberg, 2005 Rosales-Aviña <i>et al.</i> , 2011 Schulte y Geerts, 2019

También se sabe que FAM222A interactúa físicamente con gran afinidad (*in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*) con los péptidos  $\beta$ -amiloides ( $A\beta_{1-40}$  y  $A\beta_{1-42}$ ) a través de su región amino terminal (figura 13), facilitando la agregación de estos péptidos dentro de las placas amiloides y sugiriendo así, su rol patológico en la enfermedad de Alzheimer como posible factor de oligomerización en condiciones extracelulares (Yan *et al.*, 2020).



Figura 13. Representación gráfica de la región que interactúa con los péptidos  $\beta$ -amiloides, nombrada *N-terminal A $\beta$  binding domain* (NABD) por Yan y colaboradores (2020). Esta región contiene varios sitios que podrían interactuar con las proteínas  $\beta$ -amiloides, principalmente el motivo de 61-80 aminoácidos (a. a.).

### 2.3.2 Expresión de FAM222A

Datos de secuenciación masiva de ARN (RNA-seq) tejido-especifico depositados en *The Genotype-Tissue Expression* (2020) muestran que *FAM222A* se expresa principalmente en el cerebro, los testículos, la glándula pituitaria, el ovario y en la glándula adrenal.

Por otro lado, en 2014, Maeda y colaboradores realizaron un análisis de la expresión génica a través de microarreglos en células de cáncer gástrico resistentes a cisplatino y a 5-fluorouracil (agentes quimioterapéuticos usados contra varios tipos de cáncer), reportando el aumento de la expresión de *FAM222A*. Este resultado fue también reportado por Li y colaboradores (2018) cuando realizaron un transcriptoma en células de cáncer nasofaríngeo tratadas con JQ1 (1 $\mu$ M por tres horas).

Por otro lado, resultados recientes obtenidos en el transcriptoma de la línea celular MCF10A ER-Src realizado por Urióstegui y colaboradores (2020) muestran que cuando las células NT son tratadas con TPL se observa un aumento de 5.9 veces en la expresión, mientras que células TAM aumentaron 4.9 veces la expresión de *FAM222A* tras recibir el insulto (figura 14).



Figura 14. Niveles de ARN mensajero de *FAM222A* en la línea celular MCF10A ER-Src con DMSO (No transformadas y Transformadas) y con TPL a 125 nM por cuatro horas (No transformadas tratadas y Transformadas tratadas). Se muestran también los niveles de la ARN Pol II sobre el promotor de *FAM222A* (ChIP-seq) bajo las mismas condiciones antes mencionadas. En la parte superior se señala la posición de *FAM222A* dentro del cromosoma 12. Las figuras de color morado representan los transcritos anotados del gen *FAM222A*. Las figuras en color verde representan los transcritos anotados del gen anti sentido *FAM222A-AS1* de función desconocida. Los datos se visualizaron usando el servidor WashU Epigenome Browser (<https://epigenomegateway.wustl.edu/>).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Debido a los antecedentes mencionados anteriormente, *HES6*, *ZNF547* y *FAM222A* fueron elegidos principalmente en el proyecto de maestría para corroborar su expresión en respuesta al TPL en cultivos celulares humanos y así abrir el camino para determinar el rol que pudieran desempeñar estos tres genes dentro de la respuesta celular a fármacos ya que esta es hasta el momento desconocida.

Por otro lado, hasta enero del 2020 la proteína codificada por el gen *FAM222A* había sido pobremente estudiada y caracterizada, por lo cual fue elegida para analizar su expresión en respuesta también al TPL y para ser analizada *in silico*. Con la información obtenida en esta tesis se podrían comenzar a explorar las posibles funciones de la proteína.

### **4. HIPÓTESIS**

La expresión de los genes *HES6*, *ZNF547* y *FAM222A* aumenta en células no transformadas y transformadas tratadas con TPL como parte de una respuesta de la célula al insulto.

### **5. OBJETIVOS**

#### **5.1 Objetivo general**

Analizar la expresión de *HES6*, *ZNF547* y *FAM222A* en células MCF10A ER-Src tras un insulto con TPL.

## 5.2 Objetivos específicos

1. Corroborar la expresión a nivel de ARN mensajero de *HES6*, *ZNF547* y *FAM222A* en células MCF10A ER-Src, MCF7 y MDA-MB-231 con y sin TPL.
2. Analizar la expresión de la proteína codificada por *FAM222A* en células MCF10A ER-Src con y sin TPL.
3. Analizar la secuencia de la proteína codificada por *FAM222A* mediante herramientas bioinformáticas.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### 6.1 Corroborar la expresión a nivel de ARN mensajero de *HES6*, *ZNF547* y *FAM222A* en células MCF10A ER-Src, MCF7 y MDA-MB-231 con y sin TPL.

Para analizar la expresión de los genes de interés y validar los datos obtenidos en el transcriptoma, se realizaron ensayos de RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) semicuantitativa a partir de ARN (Ácido ribonucleico) de células MCF10A ER-Src (NT y TAM) incubadas con TPL 125 nM por cuatro horas.

Asimismo, para determinar si los resultados eran similares en otras líneas celulares pertenecientes al mismo linaje del modelo de oncogénesis, se realizaron ensayos de RT-PCR semicuantitativa a partir de ARN de células MCF7 y MDA-MB-231 tratadas con TPL 125 nM por cuatro horas.

### 6.2 Analizar la expresión de la proteína codificada por *FAM222A* y su localización subcelular en células MCF10A ER-Src con y sin TPL.

Para analizar cambios en la expresión a nivel proteico, se realizaron ensayos tipo Western Blot a partir de extractos totales de células MCF10A ER-Src (NT y TAM) no tratadas y tratadas con TPL 125 nM por cuatro horas.

Asimismo, para determinar si existían cambios en la localización subcelular de FAM222A inducidos por el insulto, se efectuaron ensayos de inmunofluorescencia en células MCF10A ER-Src (NT y TAM), no tratadas y tratadas con TPL 125 nM por cuatro horas.

### **6.3 Analizar la secuencia de la proteína FAM222A mediante herramientas bioinformáticas.**

Ya que no existe información sobre en qué especies está presente la proteína FAM222A, se realizó la búsqueda de ortólogos. Posteriormente se analizó la secuencia de aminoácidos de algunas especies modelo para conocer su composición y compararla con la secuencia de la proteína FAM222A humana.

Se realizaron también alineamientos múltiples para identificar probables regiones conservadas que nos ayudaran a revelar posibles motivos proteicos. Adicionalmente, se realizó la predicción de regiones intrínsecamente desordenadas de la proteína humana para saber detalles de su estructura y entender su posible función biológica.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 ANALISIS EXPERIMENTAL**

#### ***7.1.1 Cultivo celular***

La línea celular MCF10A ER-Src es una donación del Dr. Kevin Strhul de Harvard Medical School. Las células se descongelaron y se cultivaron en cajas Petri (Corning) de 10 cm<sup>2</sup> según describen Debnath *et al.* (2003) e Iliopoulos *et al.* (2009). Los pase uno y dos se realizaron con el medio de selección constituido por DMEM/F12 y suplementado con suero de caballo, penicilina/estreptomicina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), hidrocortisona, toxina del cólera, insulina y puromicina (2µg/ml). Al tercer pase, las células se cultivaron en un medio de crecimiento constituido por los componentes

descritos anteriormente, pero utilizando puromicina en una concentración de 0.5 µg/ml. Los detalles específicos de cada componente utilizado pueden verse en el apéndice. La línea celular se mantuvo a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Para la transformación, las células se trataron con tamoxifen (Sigma, Cat. H790) cuando presentaban una confluencia del 80%. El tamoxifen se agregó a cada caja Petri con medio de crecimiento fresco, en proporción 1:1 respectivamente (2 µL:1ml). Las células fueron transformadas 72 horas (adquiriendo el fenotipo canceroso).

### **7.1.2 Tratamiento con TPL**

Tanto las células NT y T de la línea celular MC10A ER-Src, fueron tratadas con TPL (Tocris Cat. 3253) a una concentración de 125 nM durante cuatro horas (condiciones usadas en el transcriptoma). Como control se utilizó DMSO, el cual es el vehículo usado para el TPL ya que este es insoluble en agua. Las mismas condiciones fueron utilizadas en las otras líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231.

### **7.1.3 Obtención de ARN y síntesis de cADN**

Las células fueron obtenidas inmediatamente al terminar los tiempos del tratamiento y se incubaron en el reactivo TRIzol (Invitrogen No. 15596026) para la extracción de ARN, siguiendo las indicaciones del proveedor. La síntesis de cADN se realizó siguiendo las instrucciones del kit para síntesis de cADN (Thermo Scientific). Las muestras de cADN se almacenaron a -20°C hasta su uso.

### **7.1.4 Análisis por RT-PCR semicuantitativo**

Se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR con Taq ADN polimerasa (Thermo Scientific No. EP0405) utilizando como templado el cADN sintetizado a partir del ARN de las células no tratadas y tratadas con TPL. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para los genes *HES6*, *ZNF547* y *FAM222A* (Tabla 4). Como control para las reacciones se

emplearon oligonucleótidos que amplifican un fragmento del gen que codifica para el gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*), que se expresa de manera constitutiva.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en la PCR para los genes de interés. F=Forward, R=Reverse.

Gen	Secuencia (5'→3'):	Tamaño del fragmento amplificado
<i>HES6</i>	F: CCA TCA GAG GAG GGA GGG AA R: CTG ACC ACA GCC CAA ATT GC	174 pb
<i>ZNF547</i>	F: CAC GTG TCC AGC ACA TCT TCA R: TCC CAC ATT CAC TGC ACA AG	143 pb
<i>FAM222A</i>	F: GGA TCT CTT GGG ACC CTC CT R: CTG ACC ACA GCC CAA ATT GC	143 pb
<i>GAPDH</i>	F: GTT CCA ATA TGA TTC CAC CC R: AAG ATG GTG ATG GGA TTT CC	100 pb

Las condiciones de amplificación para *HES6*, *ZNF547* y *FAM222A* fueron las siguientes: 94°C de desnaturalización por 5 minutos, 27 ciclos de amplificación (*HES6*) y 30 ciclos (*ZNF547* y *FAM222A*) con 94°C de desnaturalización por 30 segundos, 60°C de alineamiento por 30 segundos y 72°C de extensión por 25 segundos, y un tiempo final de extensión de 7 minutos.

Las condiciones de amplificación para *GAPDH* fueron las siguientes: 94°C de desnaturalización por 5 minutos, 25 ciclos de amplificación con 94°C de desnaturalización por 30 segundos, 53°C de alineamiento por 30 segundos y 72°C de extensión por 40 segundos, y un tiempo final de extensión de 7 minutos.

Los productos de amplificación se corrieron en geles de agarosa 2 % y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio en un transiluminador de luz ultravioleta (Stratagene - Eagle Eye II Cabinet). Las imágenes fueron capturadas utilizando un sistema digital y procesadas en Fiji-Image J NIH 1.45 software. Los experimentos fueron realizados por duplicado (muestras biológicas independientes).



### **7.1.5 Extractos totales**

Para la extracción proteica se siguió el protocolo utilizado por Gurrion y colaboradores (2017): las células se resuspendieron en 1 mL de PBS 1X frío y se lavaron dos veces (2000 revoluciones por minuto o rpm durante 5 minutos a 4°C). Posteriormente se resuspendieron en 100 µL de Buffer de homogenizado (10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.34 M Sacarosa), más inhibidores (complete 50X; Roche), DTT 1 M, PMSF 250 mM y SDS 1%). A continuación, se centrifugó durante 30 minutos a 13000 rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante para su almacenamiento a -80°C. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo utilizando la técnica descrita por Bradford (1976).

### **7.1.6 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Las proteínas obtenidas se separaron en geles SDS-PAGE al 10% (20 µg por carril). Previamente las muestras de proteínas fueron preparadas con Buffer de carga (0.2 M Tris pH 6.8, 0.4% SDS, 2 β-mercaptoetanol 0.4%, glicerol 4%, 0.1% azul de bromofenol) a una concentración final de 1X y hervidas por 7 min a 100°C. Se inició la electroforesis empleando Buffer de corrida (25 mM Tris base, 192 mM Glicina, 0.1%, SDS) a un voltaje constante de 70 voltios durante 30 min y después 2 horas a 110 voltios.

### **7.1.7 Ensayo de Western Blot**

Posteriormente las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, 0.2 µm; Cat.# 162-0112) en Tris 50 mM pH 8.8, glicina 1.92 M y metanol 20% (vol/vol), durante 3 horas a 250 miliamperios (mAmp) a 4°C. Para verificar que las proteínas se hubieran transferido a la membrana de nitrocelulosa, esta se tiñó con rojo de Ponceau (0.5g de rojo de ponceau en ácido acético al 2%) durante 10 minutos. Una vez verificada la eficiencia de la transferencia, la membrana se lavó y bloqueó con leche (Nestlé®

Carnation® Leche descremada en polvo) al 10% diluida en PBS 1X/Tween 20 al 0.1% durante 2 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo de interés (Tabla 5) disuelto previamente en una solución que contenía leche al 5% diluida en PBS 1X/Tween 20 al 0.1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez finalizado el tiempo de incubación, la membrana se lavó 6 veces (10 minutos por cada lavado) con PBS 1X/Tween 20 al 0.1% durante con el fin de eliminar el exceso del anticuerpo primario.

*Tabla 5.* Características de los anticuerpos primarios.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Especie</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>
FAM222A (Policlonal)	Conejo	1:2000	Invitrogen No. PA5-59093
STAT3-P (Monoclonal)	Ratón	1:2000	Cell Signaling Technology No. 9138S
GAPDH (policlonal)	Conejo	1:2000	Abcam No. ab9485

A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (tabla 6), el cual también se diluyó en leche al 5% en PBS 1%/Tween 0.1% y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Nuevamente se realizaron 6 lavados de 10 min cada uno con PBS 1X/Tween 20 al 0.1%.

*Tabla 6.* Características de los anticuerpos secundarios.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Especie</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>
Anti- Mouse	Cabra	1:3000	Invitrogen A-10668
Anti-Rabbit	Cabra	1:2500	Invitrogen 656120

Con el objeto de revelar las interacciones antígeno-anticuerpo se utilizó el kit de quimioluminiscencia Perkin-Elmer pmol. Las imágenes fueron tomadas en el

fotodocumentador Gel Doc TM XR+ system (Bio-Rad) y los resultados fueron analizados por densitometría (Fiji-Image J NIH 1.45 software). Los experimentos se realizaron por duplicado (muestras biológicas independientes).

### **7.1.8 Ensayo de inmunofluorescencia doble**

Las tinciones de inmunofluorescencia se realizaron en cámaras acopladas a portaobjetos con superficie adherente (Lab-tek Chamber Slide de 8 pozos, No cat.177402) con la línea celular MCF10A ER-*Src* y siguiendo SIGUIENDO las indicaciones del proveedor del anticuerpo contra FAM222A (Invitrogen; No. PA5-59093). Una vez que las células alcanzaron el 40-50% de confluencia, las células se lavaron tres veces con PBS 1X frío, después se fijaron con paraformaldehído (PFA) frío al 4% diluido en medio de cultivo durante 15 min a temperatura ambiente y a continuación se permeabilizaron con 0.5% Triton-X-100 disuelto en PBS1X por 15 min a temperatura ambiente. Se incubó con el agente bloqueante (FBS al 4% disuelto en PBS1X) durante 1 hora a temperatura ambiente. Seguido del bloqueo se incubó el anticuerpo primario contra la proteína TBP (TATA-box binding protein; control interno) durante toda la noche a 4°C (tabla 7).

*Tabla 7.* Anticuerpos utilizados para la inmunofluorescencia doble. Todos los anticuerpos fueron disueltos en agente bloqueante + Tween 20 al 0.1%.

<b>Anticuerpo</b>	<b>Especie</b>	<b>Dilución</b>	<b>Casa comercial</b>
FAM222A (Policlonal)	Conejo	1:300	Invitrogen No. PA5-59093
TBP-control (Monoclonal)	Ratón	1:1000	Invitrogen No. 3TF1-3G3
IgG (H+L) Cross- Adsorbed Secondary, Alexa 568 (rojo)	Cabra	1:500	Invitrogen No. A-11004
IgG (H+L) Cross- Adsorbed Secondary, Alexa 488 (verde)	Cabra	1:500	Invitrogen No. A-11008

Después se realizaron seis lavados con PBS 1X a temperatura ambiente y las células se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario

acoplado al fluoróforo Alexa 488. Las células se lavaron seis veces con PBS 1X a temperatura ambiente e incubadas con el anticuerpo contra FAM222A durante toda la noche a 4°C.

Pasado este tiempo, se realizaron seis lavados con PBS 1X a temperatura ambiente y se incubó el anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa 568 durante una hora. Nuevamente se realizaron seis lavados con PBS 1X y se agregó Hoechst 50 pmolar disuelto en PBS1X durante 15min a temperatura ambiente para poder visualizar los núcleos. Las imágenes fueron obtenidas a través del microscopio confocal Olympus FV1000 Upright con el objetivo 60X. Posteriormente las imágenes fueron analizadas usando el *software* Fiji-Image J NIH 1.45. Los experimentos se realizaron por triplicado (muestras biológicas independientes).

## **7.2 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO**

### **7.2.1 Búsqueda de ortólogos**

Se realizó la búsqueda de ortólogos usando la herramienta BLASTp del servidor NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y el catálogo OrthoDB v10.1 (<https://www.orthodb.org/>). Se seleccionaron y obtuvieron las secuencias de aminoácidos en formato FASTA de NCBI de *Homo sapiens* y de las especies modelo *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Bos taurus*, *Xenopus tropicalis* y *Danio rerio* para los siguientes análisis.

### **7.2.2 Búsqueda de motivos**

Se usó el programa MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) Versión 5.1.1 (<http://meme-suite.org/>) para identificar motivos *de novo* con posible función biológica. Los motivos se compararon con un alineamiento múltiple realizado en Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

### **7.2.3 Análisis de la composición de aminoácidos y predicción de regiones intrínsecamente desordenadas**

Se utilizó la herramienta ProtParam dentro del servidor ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) para analizar la composición de aminoácidos de las secuencias obtenidas anteriormente y revelar los aminoácidos más abundantes. Posteriormente, se realizó un alineamiento múltiple usando solo las secuencias de *H. sapiens*, *M. musculus*, *R. norvegicus* y *B. Taurus* para identificar regiones conservadas enriquecidas con los aminoácidos más abundantes encontrados en el análisis anterior. Debido a los resultados obtenidos, se decidió realizar la predicción de regiones intrínsecamente desordenadas de la proteína humana FAM222A usando tres servidores de acceso libre (IUPred2A (<https://iupred2a.elte.hu/>), PrDos (<http://prdos.hgc.jp/cgi-bin/top.cgi>), y PONDR-FIT (<http://original.disprot.org/pondr-fit.php>) lo que nos permitió establecer un consenso sobre las regiones probablemente desordenadas. Los valores obtenidos de cada aminoácido se encuentran en el apéndice.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 ANALISIS EXPERIMENTAL

#### 8.1.1 Los niveles de ARN mensajero de *HES6*, *ZNF547* y *FAM222A* aumentan con TPL en células MC10A ER-Src.

Para determinar los niveles de ARN mensajero de los genes de interés se realizaron ensayos de RT-PCR semicuantitativa. En la figura 15, se visualizan los resultados de dicho ensayo, donde se observa un aumento en los niveles de los transcritos de *HES6*, *ZNF547*, y *FAM222A* en células NT y TAM tratadas con TPL, confirmando los datos obtenidos en el RNA-Seq. En la figura 16 se muestran los resultados de los transcritos de los tres genes en las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 tratadas con TPL. Se observó solo el aumento de la expresión de *FAM222A* en células MDA-MB-231. No se observaron cambios notables en la expresión de *HES6* y *ZNF547* en células MCF7 y MDA-MB-231.

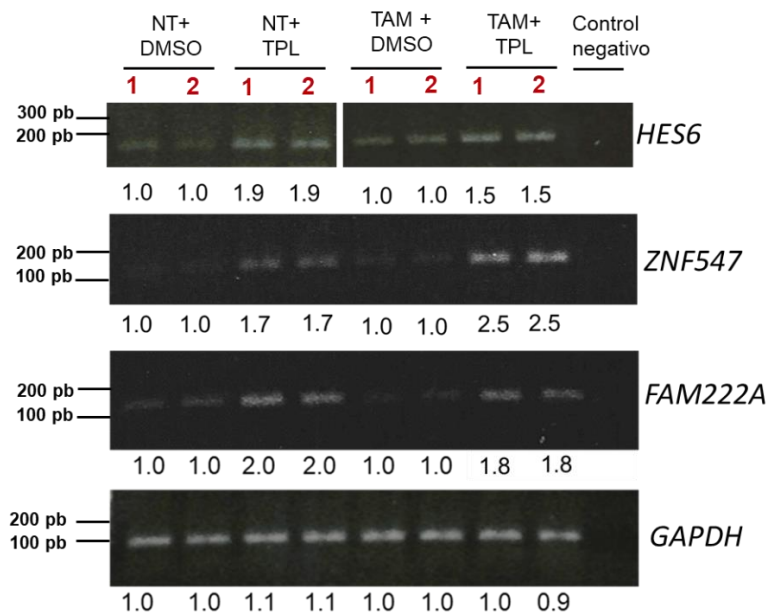


Figura 15. Gel de agarosa al 2% con los resultados de la PCR de los tratamientos con TPL=triptolide (125 nM por cuatro horas) en células MCF10A ER-Src. *GAPDH* es utilizado como control. DMSO= vehículo, NT= Células no transformadas, NT+TPL= células no transformadas tratadas; TAM= células transformadas; TAM+TPL= células

transformadas tratadas. Resultados por duplicado (muestras biológicas independientes).

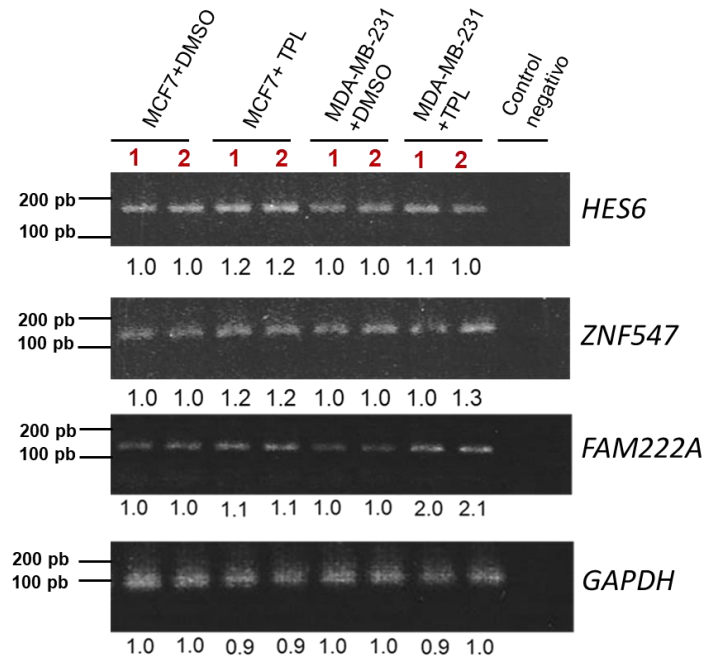


Figura 16. Gel de agarosa al 2% con los resultados de la PCR de los tratamientos con TPL=triptolide (125 mM por cuatro horas) en células MCF7 y MDA-MB-231. GAPDH es utilizado como control. DMSO = vehículo. Resultados por duplicado (muestras biológicas independientes).

### 8.1.2 Expresión de la proteína FAM222A en células MCF10A ER-Src no tratadas y tratadas con TPL

De los tres genes que se escogieron inicialmente, se decidió analizar con más detalle la expresión de FAM222A. Se realizaron ensayos tipo Western Blot para analizar la expresión a nivel de proteína. Los resultados reflejan un ligero aumento en la expresión de FAM222A en células MCF10A ER-Src tratadas, la cual es más notable en células TAM con respecto a las NT tras el insulto (figura 17). Estos resultados muestran, además, que no solo los niveles del transcrito aumentan con el tratamiento con TPL, sino también la proteína codificada por este gen.

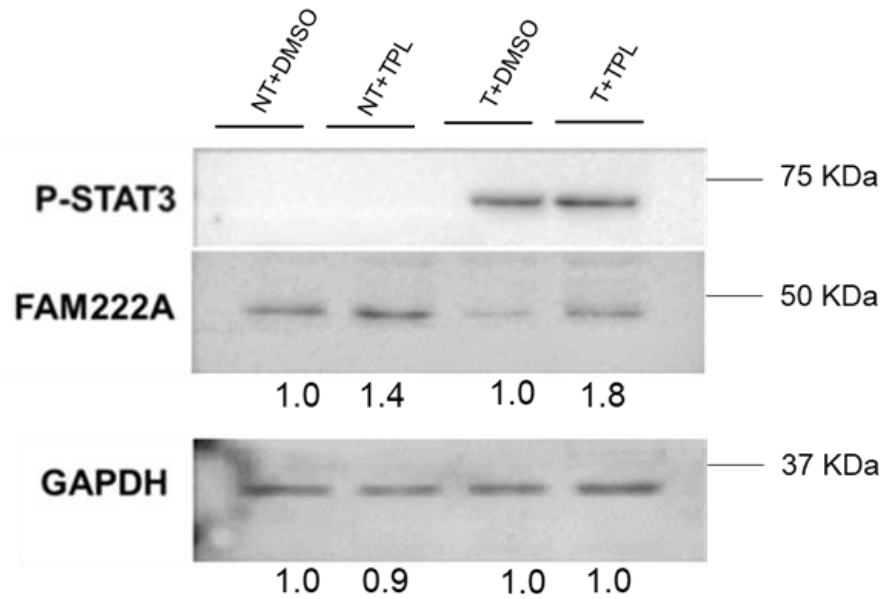


Figura 17. Resultados de Western Blot de FAM222A en células MCF10A ER-Src. STAT3-P es utilizado como control de células transformadas. GAPDH es usado como control de carga. Los valores debajo de cada membrana corresponden a la densitometría realizada. DMSO= vehículo, NT= Células no transformadas, NT+TPL= células no transformadas tratadas con triptolide; TAM= células transformadas; TAM+TPL= células transformadas tratadas con triptolide.

### 8.1.3 El tratamiento con TPL induce la formación de gránulos de FAM222A en el núcleo de células MCF10A ER-Src

Para determinar la localización subcelular de la proteína de interés, se realizaron inmunofluorescencias dobles en células NT y T, no tratadas y tratadas con TPL. Como control interno se usó a la proteína TBP cuya localización es nuclear.

Los resultados muestran un enriquecimiento de FAM222A en el núcleo. Se observa tanto en células NT y TAM la formación de pequeños cuerpos granulares. Sin embargo, estos se hacen más visibles y grandes cuando las células son tratadas con TPL, siendo este detalle más evidente en células NT tratadas (figuras 18 y 19).



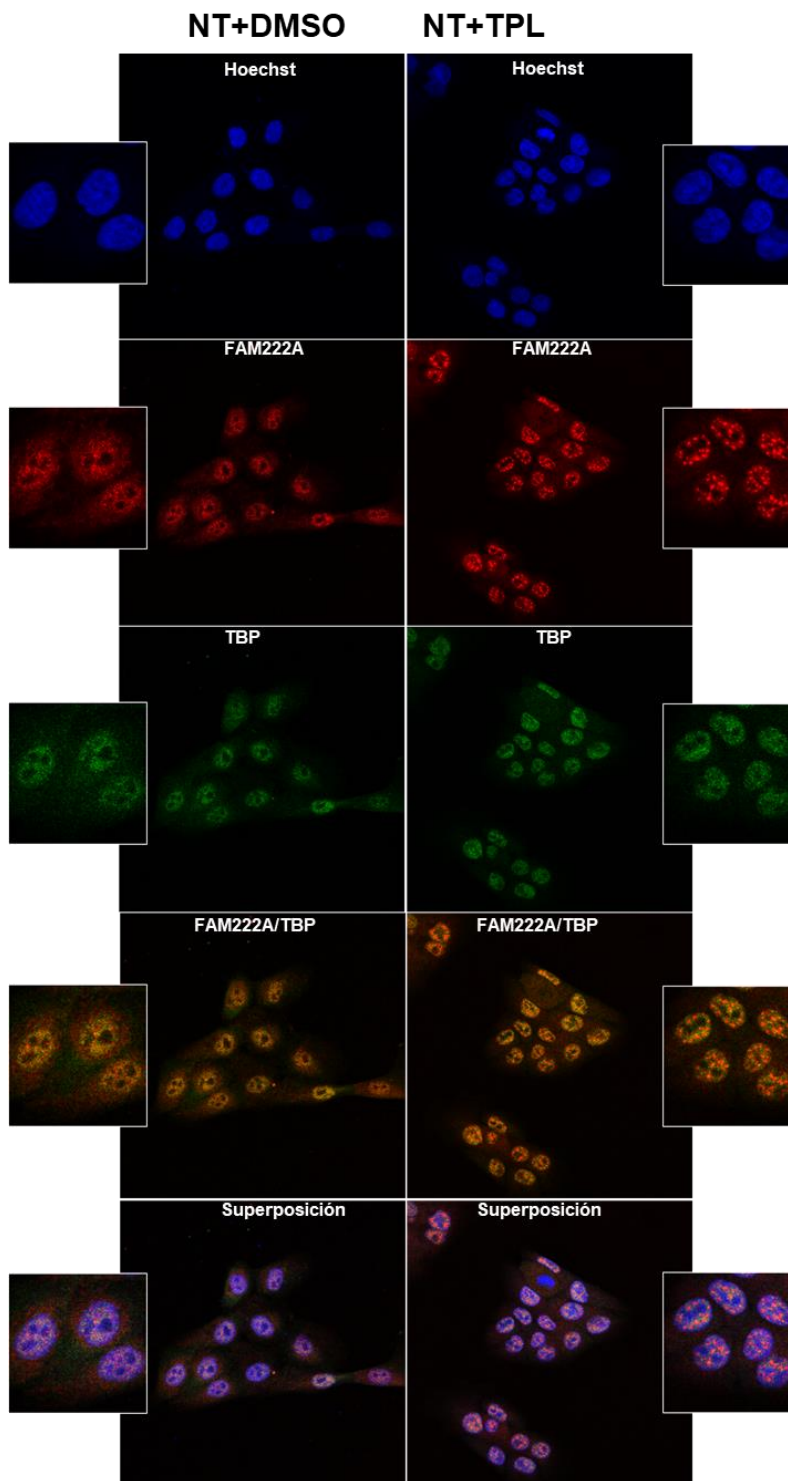


Figura 18. Resultados de inmunofluorescencias para FAM222A (Rojo Alexa 568). TBP (Alexa 488) = control interno. Las fotografías se tomaron con un aumento de 60X. DMSO= vehículo, NT= Células no transformadas; NT+TPL= células no transformadas tratadas con triptolide.

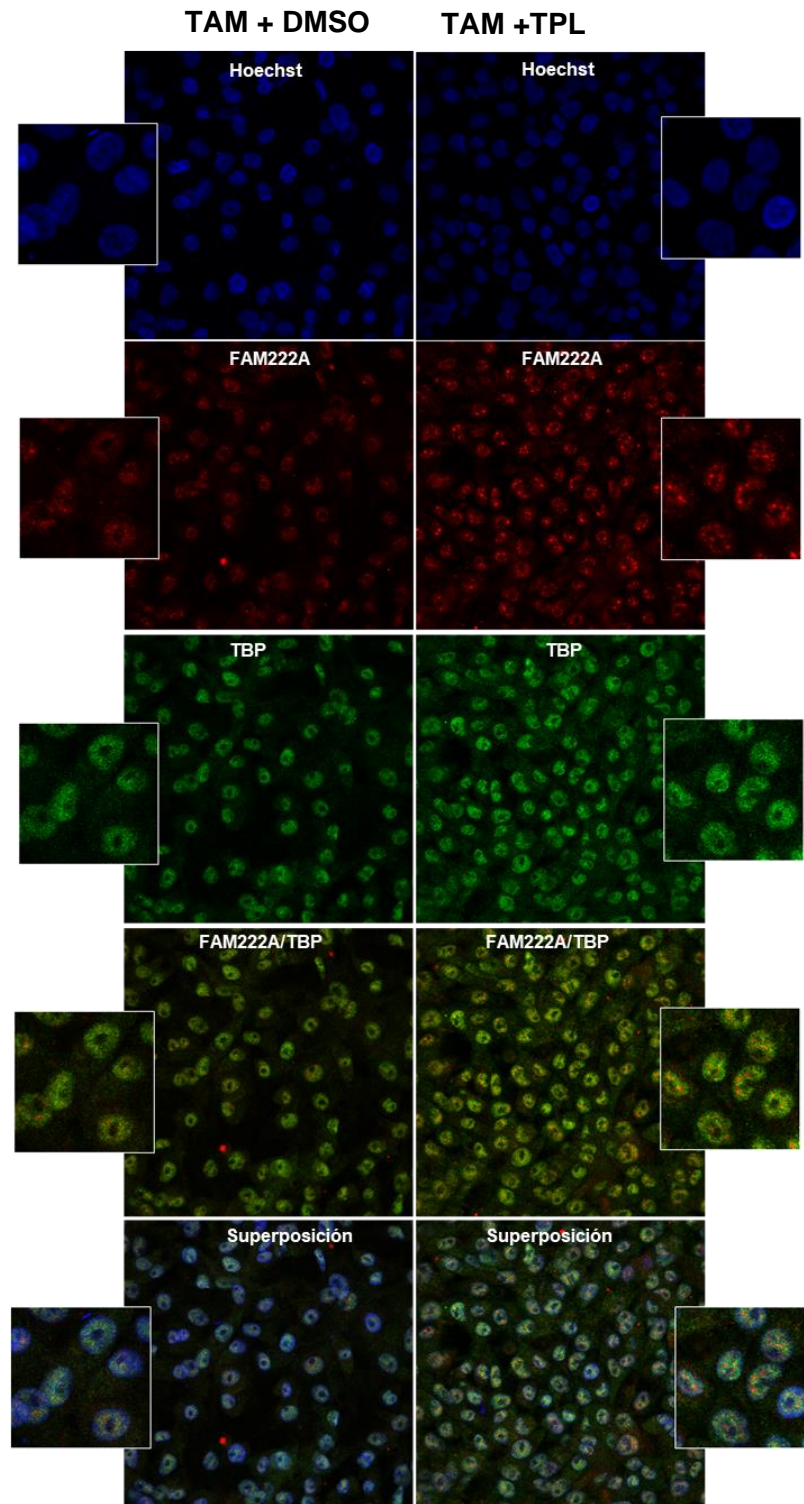


Figura 19. Resultados de inmunofluorescencias para FAM222A (Rojo Alexa 568). TBP (Alexa 488)= control interno. Las fotografías se tomaron con un aumento de 60X. DMSO= vehículo, TAM= células transformadas; TAM+TPL= células transformadas tratadas con triptolide.

## 8.2 ANALISIS BIOINFORMATICO

### 8.2.1 FAM222A está conservada en vertebrados

Se encontraron ortólogos presentes en 284 especies de vertebrados (ver apéndice), específicamente del grupo Gnathostomata, cual es un clado de vertebrados caracterizados por poseer mandíbulas articuladas.

Del total de ortólogos obtenidos, solo siete especies tienen la secuencia de la proteína FAM222A curada o revisada en NCBI (Tabla 8). El resto de las secuencias de 277 especies son consideradas como predicciones generadas automáticamente en NCBI por el algoritmo *Eukaryotic Genome Annotation Pipeline*.

Tabla 8. Genes ortólogos de FAM2222 cuya secuencia ha sido revisada o curada en NCBI.







Gen ID	Gen	Nombre científico	No. de Accesoión (NCBI)	Estatus
84915	FAM222A	<i>Homo sapiens</i>	NP_116218.2	Revisado
433940	Fam222a	<i>Mus musculus</i>	NP_001004180.1	Revisado
498193	Fam222a	<i>Rattus norvegicus</i>	NP_001102537.1	Revisado
617781	FAM222A	<i>Bos taurus</i>	NP_001193794.1	Revisado
707868	FAM222A	<i>Macaca mulatta</i>	NP_001181252.1	Revisado
780041	fam222a	<i>Xenopus tropicalis</i>	NP_001072586.1	Revisado
793922	fam222a	<i>Danio rerio</i>	NP_001119926.1	Revisado

### 8.2.2 Regiones y motivos conservados en la proteína FAM222A

Se seleccionaron las secuencias de aminoácidos de especies modelo (*Bos Taurus*, *Mus musculus*, *Rattus novergicus*, *Danio rerio* y *Xenopus tropicalis*) y de la proteína humana FAM222A, revisadas en NCBI, para realizar la búsqueda de motivos *de novo* usando la

herramienta MEME Suite. Los resultados observados en la tabla 9 muestran la presencia de seis posibles motivos de entre 21 y 50 residuos de aminoácidos con *E-values* significativos.

Tabla 9. Logos generados mediante la herramienta MEME Suite.

Motivo	Logo (MEME Suite)	E-value	Tamaño (a.a.)
1		4.6e-043	21
2		2.8e-170	50
3		9.6e-038	30
4		5.4e-094	21
5		1.9e-046	21
6		1.3e-181	50

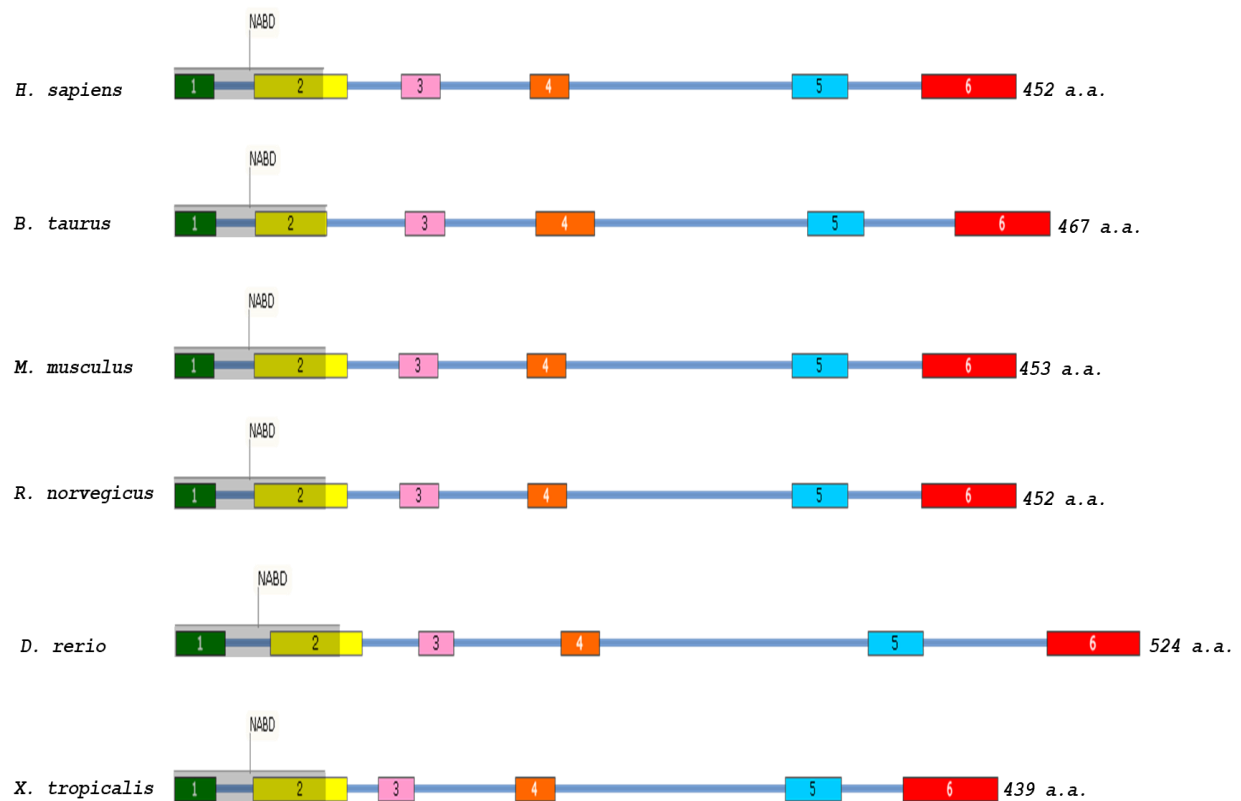
Posteriormente, usando las mismas secuencias de aminoácidos obtenidas de NCBI, se realizó un alineamiento múltiple usando la herramienta Clustal Omega. En la figura 20 se sobrelaparon los motivos encontrados anteriormente con el alineamiento múltiple en el programa SnapGene 5.1, y se pudo observar que existen seis regiones altamente conservadas, dos de las cuales son de mayor tamaño y más evidentes en el extremo carboxilo y amino terminal.

	<b>Motivo 1</b>	
<i>Bos taurus</i>	MLACIQRTQNAFGQHIA--CPT---KS----LELRKCEAVASAMHSSRYPSFAELDAYA	50
<i>Homo sapiens</i>	MLACIQRTQNAFGQHIA--CPS---KS----LELRKCEAVASAMHSSRYPSFAELDAYA	50
<i>Mus musculus</i>	MLACIQRTQNPFGQHIA--CPS---KS----LDLRKCEAVASAMHSSRYPSFAELDAYA	50
<i>Rattus norvegicus</i>	MLACIQRTQNPFGQHIA--CPS---KS----LELRKCEAVASAMHSSRYPSFAELDAYA	50
<i>Danio rerio</i>	MLACIQRTQNPFGQHIA--CPS---KS----LELRKCEAVASAMHSSRYPSFAELDAYA	59
<i>Xenopus tropicalis</i>	MLACIQRTQNPFGQHIA--ICAN---KS----LELRKCEAVASAMHSSRYPSFAELDAYA	49
	<b>Motivo 2</b>	
<i>Bos taurus</i>	EKVANSPLSIKIFPTNIRVPQHKHLSRTVNGYDTSQORYSPYE-PHTAGYQGLLAIVKAA	109
<i>Homo sapiens</i>	EKVANSPLSIKIFPTNIRVPQHKHLSRTVNGYDTSQORYSPYE-PHTAGYQGLLAIVKAA	109
<i>Mus musculus</i>	EKVANSPLSIKIFPTNIRVPQHKHLSRTVNGYDTSQORYSPYE-PHTAGYQGLLAIVKAA	109
<i>Rattus norvegicus</i>	EKVANSPLSIKIFPTNIRVPQHKHLSRTVNGYDTSQORYSPYE-PHTAGYQGLLAIVKAA	109
<i>Danio rerio</i>	QKTASSPLSIKIFPTNIRVPQHKHLSRTVNGYDTSQORYSPYELHTGGYQGLLAIVKAS	119
<i>Xenopus tropicalis</i>	QKVANNPLTIKIFPTNIRVPQHKHLSRTVNGYDTSQORYSPYE-MHTGGYQGLLAIVKAS	108
	<b>Motivo 3</b>	
<i>Bos taurus</i>	VSSSSAAAPAGPAKSVLKSAEGRRTKLSPAAVQVGVAPYFAPSTLGF-----LAVPK	162
<i>Homo sapiens</i>	VSSS--STAAPAGPAKSVLKSAEGRRTKLSPAAVQVGVAPYFAPSTLGF-----LAVPK	161
<i>Mus musculus</i>	VSSS--AHAPAGHPKSVLKSVEGRRTKLSPATVQVGIAPYFVPSLGF-----LAVPK	160
<i>Rattus norvegicus</i>	VSSS--AATPAGHTKSVLKSVEGRRTKLSPATVQVGIAPYFVPSLGF-----LAVPK	160
<i>Danio rerio</i>	SSSSSSCSSFVPSAKGVLNSEGRRTKLSPA--QIAPVAPYFPNSST-LGHCHGQIVVHT	176
<i>Xenopus tropicalis</i>	S-----KSVVENPEGRRTKLSA--QAGVAPYELSSLTQSQNCQGLSYLG	153
	<b>Motivo 4</b>	
<i>Bos taurus</i>	PPEVFA--PPFGLPAAAAPAAVIEPLFG-RGL-FLPPSNLPSIHSLLYQLNQCCQAPGAA	218
<i>Homo sapiens</i>	PPEAPA--PPFGLPAAA--TASVIEPLFG-RGL-FLPPSNLPSIHSLLYQLNQCCQAPGAA	216
<i>Mus musculus</i>	PPEAPA--PPFSLPAAA--TATSVEIPLFG-RGL-FLPPSNLPSIHSLLYQLNQCCQAPGAA	215
<i>Rattus norvegicus</i>	PPEAPA--PPFNLPAAA--TATSVEIPLFG-RGL-FLPPSNLPSIHSLLYQLNQCCQAPGAA	215
<i>Danio rerio</i>	GPPFPPEATLTVSPNVTVAAGVIVVAGGRGLNLPFOSNLPSIQSIIYQINQCCQAGALQ	236
<i>Xenopus tropicalis</i>	SQ---KHLDAFVFPNVTVAASVIEPLSSRN-L-ALQCSNLPSIQSIIYQINQCCQAGASH	207
<i>Bos taurus</i>	FAACQAVPG---PPFSPAKHGFPVPGFFRT-----AYSATAGFPCECRKGAELGQG	264
<i>Homo sapiens</i>	FPACQGMAL---PPFSPAKHGFPVPSFFSM-----AYSAAAGLPDCRKGTELGQG	262
<i>Mus musculus</i>	PSACQGVAV---PPFSPAKHGFPVPSFFNL-----AYSATAGLPDCRKGTELSQG	261
<i>Rattus norvegicus</i>	PSACQGVAV---PPFSPAKHGFPVPSFFRV-----AYSATAGLPDCRKGTELSQG	261
<i>Danio rerio</i>	-QVCGTGTGTFPSPSFGTINSGGTYVTGVAPQGNMFPYSG-TVI-----PG	284
<i>Xenopus tropicalis</i>	-QACQGVVVT---NSSESQGMANGFTS--MTG-----NAAAYSQ-TVLQDCRGGSEIALG	256
<i>Bos taurus</i>	STPAALTLGAAKPAYADGGLDYLWPKPPPPPPPPQPLRAYGGGALA--S--KSP	320
<i>Homo sapiens</i>	ATQ-ALTLGAAKPAYADSGLDYLWPKPPP---PPQPLRAYSGSTVA--S--KSP	314
<i>Mus musculus</i>	ATP-ALTLGATKPAYAEGGLDYLWPKPPP---PPQPLRAYSSSTVA--GRSQSP	315
<i>Rattus norvegicus</i>	ATP-ALTLGATKPAYSEGLDYLWPKPPP---PPQPLRAYSSSTVA--ASKSP	314
<i>Danio rerio</i>	QNGE-----VLKAGVYFEGMDYLLWQKQHHHQ-QQAVLRMYSGSGGGGGAISRSP	336
<i>Xenopus tropicalis</i>	SAPV-----VTRTGSYQEGMDYLLWQKQKQ-----QQLRIYSGSGGGGGAISRSP	301
	<b>Motivo 5</b>	
<i>Bos taurus</i>	AQGG-----RAYERASGSEPLNCGVGLPASFTVGYFAAP	354
<i>Homo sapiens</i>	AQGG-----RAYERASGSEPLNCGVGLPASFTVGYFAAP	348
<i>Mus musculus</i>	ICGG-----RAYERANGSEPLNCGMGLPASFTVGYFAAP	349
<i>Rattus norvegicus</i>	TCGG-----RAYERANGSEPLNCGMGLPASFTVGYFAAP	348
<i>Danio rerio</i>	TGGFVGSIMLGAQVSSSRGYPMIATSTGGGGLEKVSSEPLNCGVMHGNFVGYFAAP	395
<i>Xenopus tropicalis</i>	VTPGVPRTY-----TLASAVKVSSEPLNCGVMHGNFVGYFAAP	342
<i>Bos taurus</i>	WNSVLVPTSDCYNPAAAAAAG-TELGPAA-----REL	395
<i>Homo sapiens</i>	WNSVLVPTSDCYNPAAAV-----VV-TELGPAA-----REL	380
<i>Mus musculus</i>	WNSVLVPTSDCYNPAAAA-----VV-TELGPAA-----REL	381
<i>Rattus norvegicus</i>	WNSVLVPTSDCYNPAAAA-----VV-TELGPAA-----REL	380
<i>Danio rerio</i>	WNSVLVPTSDCYNPQELPGATTTAGFVTGHRLELGFPHHHQHPPHHHHHHHHHHPP	455
<i>Xenopus tropicalis</i>	WNSILVPTSDCYNPQELANG-----HRDLGVHP-----REL	371
	<b>Motivo 6</b>	
<i>Bos taurus</i>	AGPPAETLSGLFSKSVNCTAVLSSLSQSLYLINDIRPPCIKERMLGRGYETVAVPRLLD	455
<i>Homo sapiens</i>	AGPPADALSGLFSKSVNCTAVLSSLSQSLYLINDIRPPCIKERMLGRGYETVAVPRLLD	440
<i>Mus musculus</i>	AGPPDVLGSLTSLKSVNCTAVLSSLSQSLYLINDIRPPCIKERMLGRGYETVAVPRLLD	441
<i>Rattus norvegicus</i>	AGPPVDLGLTSLKSVNCTAVLSSLSQSLYLINDIRPPCIKERMLGRGYETVAVPRLLD	440
<i>Danio rerio</i>	IDSTGGLCCSLFSKSVNCTAVLSSLSQSLYLINDIRPPCIKERMLGRGYETVAVPRLLD	515
<i>Xenopus tropicalis</i>	---SDGLTSLFSKSVNCTAVLSSLSQSLYLINDIRPPCIKERMLGRGYETVAVPRLLD	427
<i>Bos taurus</i>	HQHAHIRLQVYR	467
<i>Homo sapiens</i>	HQHAHIRLQVYR	452
<i>Mus musculus</i>	HQHAHIRLQVYR	453
<i>Rattus norvegicus</i>	HQHAHIRLQVYR	452
<i>Danio rerio</i>	HQHAHIRLQVYR	527
<i>Xenopus tropicalis</i>	HQHAHIRLIYR	439

Figura 20. Alineamiento múltiple de las secuencias de especies modelo y la proteína humana FAM222A. Las barras verticales de color verde, amarillo, rosa, naranja, azul y rojo muestran la posición de los motivos con posible función biológica encontrados usando la herramienta MEME suite. Las secuencias sombreadas corresponden a la región NABD reportada por Yan y colaboradores (2020). La región puntuada corresponde al motivo core 61-80 de la proteína humana importante para la interacción

con proteínas  $\beta$ -amiloides. En color negro se indican los posibles sitios conservados de fosforilación donde podría ser blancos de la quinasa NLK en humanos.

En el alineamiento, también es posible observar que la región NABD estudiada por Yan y colaboradores (2020) sobrelapa con el motivo uno y la mayor parte del motivo dos. La localización y representación esquemática de todos los motivos a lo largo de las secuencias de aminoácidos se observa en la figura 21.



*Figura 21.* Representación esquemática de los motivos encontrados usando la herramienta MEME suite y su localización. La zona sombreada corresponde a la región nombrada NABD que interacciona con proteínas  $\beta$ -amiloides.

### **8.2.3 En mamíferos, la proteína FAM222A es rica en alaninas y prolinas.**

Debido a que no se conoce la composición de aminoácidos de la proteína FAM222 humana y de sus ortólogos, se decidió analizar las secuencias utilizando la herramienta ProtParam dentro del servidor *ExPASy*. Los resultados obtenidos en la figura 22 muestran que la proteína de estudio de las especies representativas de mamífero (incluyendo *H. sapiens*) son ricas en alaninas y prolinas. En el caso de *D. rerio* se observa que la proteína es rica en serinas y prolinas, mientras que en *X. tropicalis*, la secuencia esta enriquecida con serinas, leucinas, glutaminas y prolinas en menor proporción con respecto a todas las secuencias analizadas.

Los resultados anteriores también levantaron la sospecha de que la FAM222A humana era probablemente una proteína intrínsecamente desordenada por estar enriquecida por aminoácidos considerados de desorden (A, P, G, S) dentro de su secuencia.

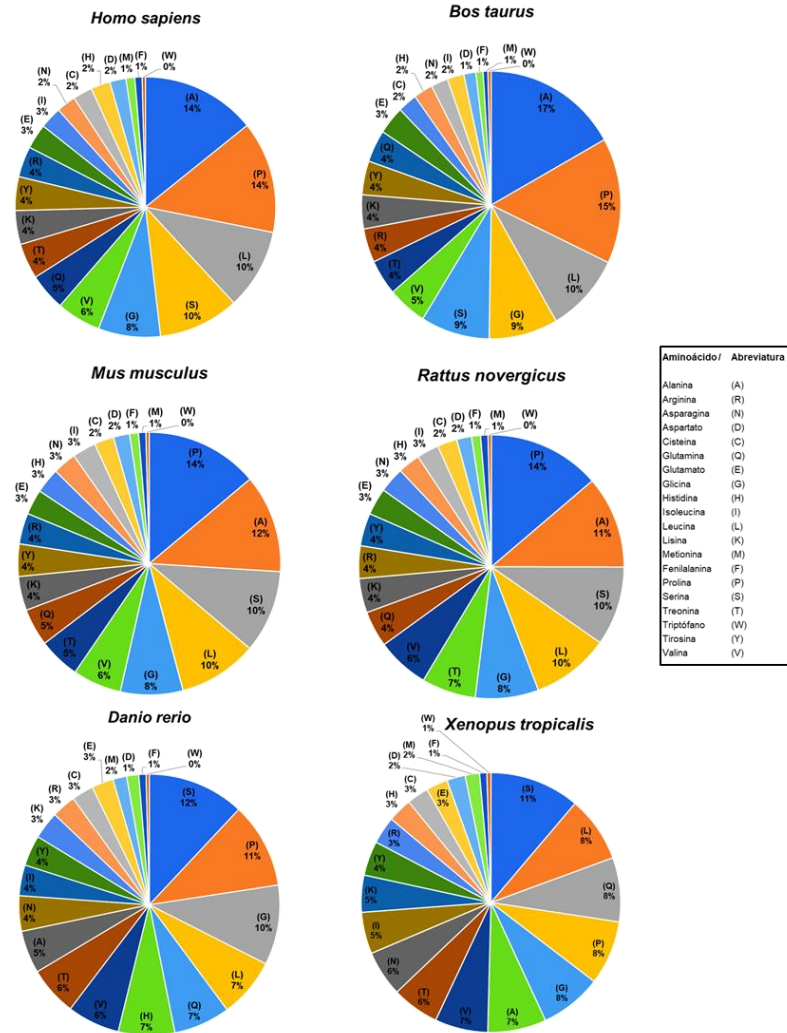


Figura 22. Graficas de pastel representado los resultados obtenidos mediante la herramienta ProtParam. La composición específica de cada una de las secuencias puede verse en el apéndice.

Es importante mencionar que, con base a los resultados anteriores, se decidió realizar un alineamiento múltiple solo usando las secuencias representativas de mamíferos. Esto permitió ubicar dos regiones ricas en prolinas no repetidas y repetidas respectivamente en la región central cuya secuencia consenso es PKPPEAPAPPGLP (14 aminoácidos) y PQKPPPPPPQP (11 aminoácidos) las cuales probablemente sean importantes para la interacción proteína-proteína y proteína-ADN (Figura 23).

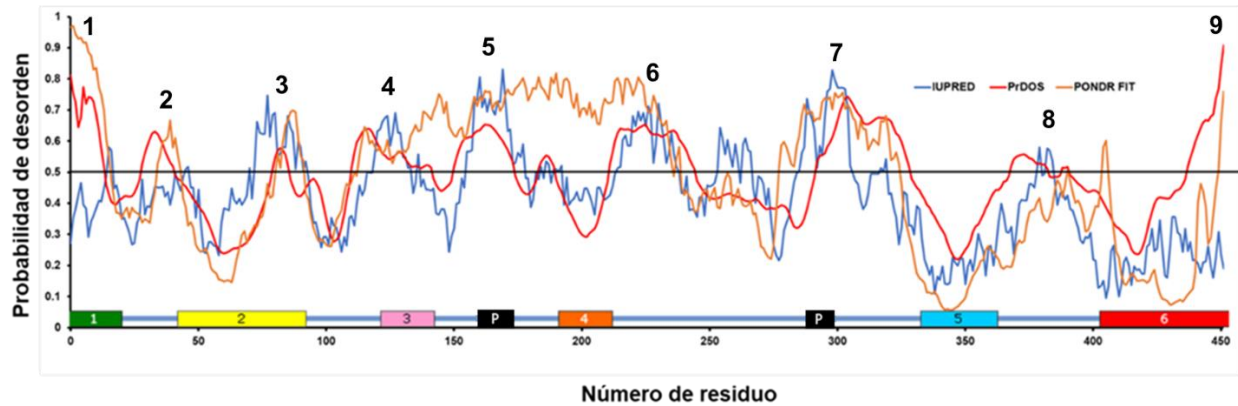


<i>Bos taurus</i>	GPAKSVLKSAEGKRTKLSAAVQVGVAPYPAPSTLGLAYPKPPEVPAPPPGLPAAAAFA	180
<i>Homo sapiens</i>	GPAKSVLKSAEGKRTKLSAAVQVGIAPYPVSTLGLAYPKPPEVPAPPPGLPAAA-TA	178
<i>Mus musculus</i>	GHPKSVLKSVEGKRTKLSPATVQVGIAPYPVSTLGLAYPKPPEVPAPPPGLPAAA-TA	177
<i>Rattus norvegicus</i>	GHTKSVLKSAEGKRTKLSPATVQVGIAPYPVSTLGLAYPKPPEVPAPPPGLPAAA-TA	177
<i>Bos taurus</i>	AAVIVLPGRGLPLPPSNLPSIHSLLYQLHQCCQAPGAAPACQAVFGPPSPAKHGPVFG	240
<i>Homo sapiens</i>	ASVIVLPGRGLPLPPSNLPSIHSLLYQLNQCCQAPGAAPPACQGMATPHPSPAKHGPVPS	238
<i>Mus musculus</i>	TSVIVLPGRGLPLPPSNLPSIHSILYQLNQCCQAPGAAPSACQGVAVPHPSPAKHGPVPS	237
<i>Rattus norvegicus</i>	TSVIVLPGRGLPLPPSNLPSIHSILYQLNQCCQAPGVAAPSACQGVAVPHPSPAKHGPVPS	237
<i>Bos taurus</i>	FFRTAYSATAGPEECRKGAEELGQGSTPAALTLAGAAKPAGYADGGLDYLLWPKPKPPPPP	300
<i>Homo sapiens</i>	FFSMAYSAAGLFDCCRKGTELGQGATQ-ALTLAGAAKPAGYADSGLDYLLWPKPKPP---	294
<i>Mus musculus</i>	FFNLAYSATAGLFDCCRKGTELSQGATP-ALTLAGATKPAGYAEGLDYLLWPKPKPP---	293
<i>Rattus norvegicus</i>	FFRVAYSATAGLFDCCRKGTELSQGATP-ALTLAGATKPAGYSEGLDYLLWPKPKPP---	293
<i>Bos taurus</i>	PPPPLRAYGGGALAS--KSPKACGGRAYERASGSPLNCGVGLPASFTVGQYFAAPWNSV	358
<i>Homo sapiens</i>	PPPPLRAYSGSTVAS--KSPKACGGRAYERASGSPLNCGVGLPTSFTVGQYFAAPWNSV	352
<i>Mus musculus</i>	PPPPLRAYSSSTVAGKSQSPKICGGRAFERANGSPHNCGMGLPGSFTVGQYFAAPWNSV	353
<i>Rattus norvegicus</i>	PPPPLRAYGSSSTV-ASKSPKTCGGRFAFERANGSPHNCGMGLPGGFTVGQYFAAPWNSV	352

Figura 23. Alineamiento múltiple donde se muestran regiones conservadas de la proteína FAM222A de mamíferos. Las secuencias mostradas en color negro representan a las regiones ricas en prolinas.

#### 8.2.4 La proteína FAM222A humana posee varias regiones intrínsecamente desordenadas

La sospecha de que FAM222A podría ser una proteína intrínsecamente desordenada llevó a que se realizará la predicción de regiones desordenadas dentro de su secuencia utilizando tres herramientas de libre acceso en la web: IUPred2A (*long disorder*), PrDOS y PONDER FIT. Estos programas calculan la probabilidad de desorden de cada uno de los aminoácidos dentro de una secuencia, donde el *cut off* es igual a 0.5 en todos los casos. Los resultados obtenidos (ver apéndice) fueron graficados y representados en la figura 24. Se pueden observar nueve posibles regiones desestructuradas a lo largo de la secuencia de FAM222A, de las cuales es interesante notar que la región uno sobrelapa con el motivo uno, la región tres sobrelapa parcialmente con el motivo dos, la región cuatro sobrelapa con el motivo tres y la región nueve sobrelapa parcialmente con el motivo seis. Por otro lado, se observan tres regiones con valores menores a 0.5 que sobrelapan con el motivo dos, cinco y seis que podrían tener alguna estructura o plegamiento. Los resultados anteriores, podrían indicar que la proteína FAM222A podría ser una proteína intrínsecamente desordenada.



*Figura 24.* Predicción de regiones intrínsecamente desordenadas dentro de la secuencia de la proteína humana FAM222A. Los valores arriba de 0.5 (línea horizontal negra) indican desorden, valores menores indican regiones con posible estructura secundaria. Las cajas de color verde, amarillo, rosa, azul y rojo indican la posición de los motivos conservados identificados usando MEME Suite. Las cajas de color negro indican los motivos ricos en prolina.

## 9. DISCUSIÓN

Fármacos como el TPL han permitido estudiar a detalle algunos de los eventos de respuesta celular inducidos por el tratamiento como son la inhibición de la transcripción, la inducción de apoptosis, inhibición del ciclo celular y proliferación, inhibición de angiogénesis, inhibición de invasión y de metástasis (Noel et al, 2020).

Estudios recientes muestran que el uso de TPL a concentraciones nanomolares (Urióstegui *et al.*, 2020) puede inducir una expresión diferencial a tiempos cortos. En el grupo del laboratorio del Dr. Mario Zurita, un análisis del transcriptoma de células MCF10A ER-Src reveló el aumento inesperado en la expresión de un grupo de genes tras un insulto con TPL, entre los que se encuentran *HES6*, *ZNF547* y *FAM222A*.

Se realizó el análisis de la expresión de los genes de interés en tres líneas celulares del linaje mamario bajo las mismas condiciones que el transcriptoma realizado en el laboratorio con el objetivo de comprobar el aumento de la expresión tras el tratamiento con TPL. Los resultados mostraron que *HES6*, *ZNF547* y *FAM222A* aumentan su expresión tras el insulto en células NT y TAM de la línea celular MCF10A ER-Src.

En las otras líneas celulares, MCF7 y MDA-MB-231, la expresión de *HES6* y *ZNF547* no parece aumentar claramente con el tratamiento pues los niveles de transcritos se notan muy parecidos. En el caso de los niveles de transcritos de *FAM222A*, es notable apreciar un aumento en los valores de las densitometrías realizadas de las RT-PCR semicuantitativas de células MDA-MB-231, no habiendo cambios aparentes para el caso de células MCF7. Estos resultados no son concluyentes por lo que es necesario realizar experimentos de RT-PCR cuantitativo a partir de células de diferente linaje, no cancerosas y cancerosas tratadas con TPL a diferentes tiempos.

Por otro lado, se realizaron ensayos tipo western blot para visualizar cambios a nivel de proteína de *FAM222A* en respuesta al TPL. El ensayo no mostro valores similares a los

obtenidos en las RT-PCRs semicuantitativas pues solo se observó un ligero aumento en los niveles de proteína en células NT y TAM tratadas. Sin embargo, los niveles parecen ser más elevados en células NT no tratadas y tratadas que en células TAM no tratadas y tratadas con TPL. Debido a los resultados anteriores, sería conveniente realizar experimentos por citometría de flujo para poder comparar valores *bonafide* de la proteína FAM222A entre células NT y TAM, no tratadas y tratadas con TPL.

Se realizaron posteriormente ensayos de inmunofluorescencias dobles en células NT y TAM para FAM222A con el objetivo de determinar su localización subcelular cuando su expresión es inducida con el tratamiento. Bases de datos previas reportaban que esta proteína se localiza en la membrana plasmática, en la mitocondria, sitios de adhesión focal y el núcleo (Huttlin *et al.*, 2017; *The Human Protein Atlas*, 2020). Sin embargo, los resultados muestran que la proteína FAM222A está preferencialmente enriquecida en el núcleo de células MCF10A ER-Src, formando diminutos gránulos. Interesantemente y de forma inesperada, se observa que el tratamiento con TPL provoca la formación de gránulos definidos y de mayor tamaño dentro del núcleo, sobre todo en células NT tratadas. Este resultado es similar al observado de forma extracelular en pacientes y ratones modelo con Alzheimer cuando FAM222A se une con las proteínas  $\beta$ -amiloides para formar agregados (Yan *et al.*, 2020). En el caso de las células MCF10A ER-Src, probablemente dentro de estos gránulos FAM222A esta interactuando con otros interactores proteicos o ácidos nucleicos, por lo cual es importante realizar experimentos para determinar la identidad de estos, la cual podría ser diferente en entre células no cancerosas (NT) y cancerosas (T), tratadas y no tratadas con TPL.

Por otro lado, el análisis bioinformático reveló algunos detalles interesantes acerca de la proteína FAM222A. La búsqueda de ortólogos reveló la proteína se encuentra en 284 especies, sugiriendo que este gen está conservado en vertebrados, específicamente en el grupo Gnathostomata.

La proteína FAM222A no contiene dominios, motivos o secuencias señal reportados en las bases de datos dentro de su secuencia. Es por esta razón que se realizó un alineamiento múltiple, revelando algunas regiones conservadas que podrían contener motivos con función biológica relevante entre las especies *H. sapiens*, *B. taurus*, *M. musculus*, *R. norvegicus*, *D. rerio* y *X. tropicalis*. Para identificar estos motivos, se utilizó la herramienta MEME Suite revelando al menos seis posibles motivos proteicos. El solapamiento de estos motivos con el alineamiento múltiple muestra que estos se encuentran en las regiones más conservadas y que, además, la región NABD descrita por Yan y colaboradores (2020) está conservada en la evolución, especialmente el motivo *core* de 61-80 aminoácidos, el cual es esencial para la unión con proteínas  $\beta$ -amiloides y se encuentra dentro del motivo dos identificado en este proyecto.

Asimismo, el análisis de la composición de aminoácidos mostró que la FAM222A en mamíferos (*H. sapiens*, *B. taurus*, *M. musculus* y *R. norvegicus*) es rica en alaninas y prolinas. Estos resultados llevaron a realizar un segundo alineamiento usando las secuencias de las especies antes mencionadas y se observó la presencia de varios sitios de prolinas y alaninas. Sin embargo, hubo especial interés en dos regiones conservadas con prolinas no repetidas y repetidas (PKPPEAPAPPPGLP y PQQPPPPPPQP).

Regiones como estas podrían considerarse como motivos ricos en prolinas (*Prolin-Rich Motifs* o PRMs) que podrían formar hélices de poliprolina, las cuales son una estructura secundaria formada por tres residuos que forman una vuelta. Estos motivos tienen una gran importancia ya que se sabe que son sitios de baja afinidad y alta especificidad que permiten la interacción con proteínas que contienen dominios SH3, WW, GYF y UEV implicados en la transducción de señales (Zarrinpar *et al.*, 2003; Freund *et al.*, 2008; Meirson *et al.*, 2020). Dentro de la proteína FAM222A podrían existir más PRMs debido a la abundancia de prolinas a lo largo de la secuencia, sin embargo, es difícil identificarlos ya que actualmente no existen servidores públicos confiables que permitan predecir estos motivos.

Los PRMs también se han visto presentes en factores reguladores de la transcripción e involucrados en la unión proteína-ADN (Mermoud *et al.*, 1989; Adzhubei *et al.*, 2013; Kumar y Bansal, 2016; Narwani *et al.*, 2017), por lo que los resultados obtenidos en este proyecto sugieren que la proteína FAM222A podría interactuar con ácidos nucleicos y/o con proteínas diferentes a las reportadas por Huttlin y colaboradores (2017).

Por último, y con base en los resultados obtenidos, se sospechaba que FAM222A pudiera ser una proteína intrínsecamente desordenada, por lo cual se realizó la predicción de regiones desestructuradas a lo largo de la secuencia de aminoácidos. Los resultados obtenidos mostraron nueve posibles regiones desordenadas, de las cuales algunas sobrelapaban con los motivos conservados identificados en este proyecto. Sin embargo, también se observaron cinco regiones con posible estructura secundaria. Este análisis fue realizado antes de que, en el 2020, Yan y colaboradores publicaran el artículo en el cual reportan que FAM222A se une a péptidos  $\beta$ -amiloides y que es una proteína intrínsecamente desordenada según los resultados obtenidos experimentalmente por dicroísmo circular, lo que confirma nuestras predicciones realizadas. Debido a que la proteína FAM222A podría no tener una estructura tridimensional definida, esta característica podría conferirle una conformación y función diferente dependiendo del contexto celular en el que se encuentre.

Sin duda alguna, la información recientemente publicada de FAM222A y los resultados obtenidos en este proyecto abren un nuevo camino para que esta proteína sea estudiada ampliamente, sobre todo en el contexto nuclear. Además, los estudios podrían extrapolarse a la proteína paróloga FAM222B de función desconocida, y sobre todo ayudar a entender mejor los mecanismos de FAM222A en la enfermedad de Alzheimer.

De forma general, los resultados obtenidos en este proyecto demuestran el aumento en la expresión de *HES6*, *ZNF547* y *FAM222A* tras un insulto con TPL, el cual a su vez podría estar involucrado en algún tipo de respuesta celular para que las células

sobrevivan o mueran tras ser tratadas con fármacos. Sin embargo, es necesario realizar más estudios exhaustivos para comprobar las hipótesis antes mencionadas.

## 10. CONCLUSIONES

- El tratamiento con TPL aumenta la expresión de los genes *HES6*, *ZNF547* y *FAM222A* en células MCF10A ER-Src NT y TAM.
- La localización subcelular de FAM222A en células MCF10A ER-Src NT y TAM no tratadas y tratadas con TPL es preferencialmente nuclear.
- El tratamiento con TPL induce la formación de gránulos de FAM222A dentro del núcleo celular de células MCF10A ER-Src NT y TAM.
- La proteína FAM222A esta conservada en el grupo de vertebrados Ghnostomata y, en mamíferos, su secuencia es rica en alaninas y prolinas.
- Existen seis nuevos motivos con posible función biológica dentro de la secuencia de FAM222A.
- La proteína FAM222 es una proteína intrínsecamente desordenada en la mayor parte de su estructura.



## 11. PERSPECTIVAS

-Determinar la localización subcelular de las proteínas HES6 y ZNF547 tras el tratamiento con TPL.

-Silenciar la expresión de *HES6*, *ZNF547* y *FAM222A* y evaluar su posible función dentro de la respuesta celular (apoptosis, ciclo celular, viabilidad y proliferación) tras el insulto con TPL.

-Evaluar la expresión de los tres genes ante otros tipos de fármacos o agentes inductores de estrés (daño al ADN por UV, estrés por calor) en líneas celulares provenientes de un linaje diferente al mamario.

-Realizar una co-inmunoprecipitación acoplada a espectrometría de masas para identificar las proteínas que están interactuando con HES6, ZNF547 y FAM222A cuando células son tratadas con TPL.

-Realizar un CHIP-Seq contra las tres proteínas antes mencionadas para visualizar su posición en el genoma y determinar posibles genes regulados por los mismos.

-Determinar si los seis motivos identificados en este proyecto y los motivos ricos en prolina tienen alguna función biológica.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Adzhubei, A. A., Sternberg, M. J. E., & Makarov, A. A. (2013). Polyproline-II Helix in Proteins: Structure and Function. *Journal of Molecular Biology*, 425(12), 2100-2132. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.03.018>
2. Banerjee, S., Thayanithy, V., Sangwan, V., Mackenzie, T. N., Saluja, A. K., & Subramanian, S. (2013). Minnelide reduces tumor burden in preclinical models of osteosarcoma. *Cancer Letters*, 335(2), 412-420. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.02.050>
3. Bessho, Y., Sakata, R., Komatsu, S., Shiota, K., Yamada, S., & Kageyama, R. (2001). Dynamic expression and essential functions of Hes7 in somite segmentation. *Genes & Development*, 15(20), 2642-2647. <https://doi.org/10.1101/gad.930601>
4. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
5. Carvalho, F. L. F., Marchionni, L., Gupta, A., Kummangal, B. A., Schaeffer, E. M., Ross, A. E., & Berman, D. M. (2015). HES6 promotes prostate cancer aggressiveness independently of Notch signalling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(7), 1624-1636. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12537>
6. Cassandri, M., Smirnov, A., Novelli, F., Pitolli, C., Agostini, M., Malewicz, M., Melino, G., & Raschellà, G. (2017). Zinc-finger proteins in health and disease. *Cell Death Discovery*, 3(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.71>
7. Compe, E., & Egly, J.-M. (2016). Nucleotide Excision Repair and Transcriptional Regulation: TFIIH and Beyond. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 265-290. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014857>

8. Corson, T. W., Cavga, H., Aberle, N., & Crews, C. M. (2011). Triptolide Directly Inhibits dCTP Pyrophosphatase. *ChemBioChem*, 12(11), 1767-1773. <https://doi.org/10.1002/cbic.201100007>
9. Cowell, J. K., LaDuca, J., Rossi, M. R., Burkhardt, T., Nowak, N. J., & Matsui, S. (2005). Molecular characterization of the t(3;9) associated with immortalization in the MCF10A cell line. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 163(1), 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2005.04.019>
10. Debnath, J., Muthuswamy, S. K., & Brugge, J. S. (2003). Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods*, 30(3), 256-268. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(03\)00032-X](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(03)00032-X)
11. de Oliveira Mann, C. C., Kiefersauer, R., Witte, G., & Hopfner, K.-P. (2016). Structural and biochemical characterization of the cell fate determining nucleotidyltransferase fold protein MAB21L1. *Scientific Reports*, 6(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/srep27498>
12. Ecco, G., Imbeault, M., & Trono, D. (2017). KRAB zinc finger proteins. *Development*, 144(15), 2719-2729. <https://doi.org/10.1242/dev.132605>
13. Endo, A., Ly, T., Pippa, R., Bensaddek, D., Nicolas, A., & Lamond, A. I. (2017). The Chromatin Assembly Factor Complex 1 (CAF1) and 5-Azacytidine (5-AzaC) Affect Cell Motility in Src-transformed Human Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 292(1), 172-184. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.751024>
14. Ensembl (2 de marzo, 2020). Gene: HES6 (ENSG00000144485) - Splice variants - *Homo sapiens*. Recuperado de: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Splice?db=core;g=ENSG00000144485;r=2:238238267-238240662](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Splice?db=core;g=ENSG00000144485;r=2:238238267-238240662)
15. Ensembl (2 de marzo, 2020). Gene: ZNF547 (ENSG00000152433) – Transcript Comparison - *Homo sapiens*. Recuperado de

[http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/TranscriptComparison?db=core;g=ENSG00000152433;r=19:57363477-57379565](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/TranscriptComparison?db=core;g=ENSG00000152433;r=19:57363477-57379565)

16. Ensembl (2 de marzo, 2020). Gene: FAM222A (ENSG00000139438) – Transcript Comparison - *Homo sapiens*. Recuperado de [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/TranscriptComparison?db=core;g=ENSG00000139438;r=12:109713825-109770495;t=ENST00000358906](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/TranscriptComparison?db=core;g=ENSG00000139438;r=12:109713825-109770495;t=ENST00000358906)
17. Fisher, R. P. (2005). Secrets of a double agent: CDK7 in cell-cycle control and transcription. *Journal of Cell Science*, 118(22), 5171-5180. <https://doi.org/10.1242/jcs.02718>
18. Freund, C., Schmalz, H.-G., Sticht, J., & Kühne, R. (2008). Proline-Rich Sequence Recognition Domains (PRD): Ligands, Function and Inhibition. En E. Klussmann & J. Scott (Eds.), *Protein-Protein Interactions as New Drug Targets* (pp. 407-429). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-72843-6\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-540-72843-6_17)
19. Gao, H., Zhang, Y., Dong, L., Qu, X.-Y., Tao, L.-N., Zhang, Y.-M., Zhai, J.-H., & Song, Y.-Q. (2018). Triptolide induces autophagy and apoptosis through ERK activation in human breast cancer MCF-7 cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(4), 3413-3419. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.5830>
20. Giri, B., Gupta, V. K., Yaffe, B., Modi, S., Roy, P., Sethi, V., Lavania, S. P., Vickers, S. M., Dudeja, V., Banerjee, S., Watts, J., & Saluja, A. (2019). Pre-clinical evaluation of Minnelide as a therapy for acute myeloid leukemia. *Journal of Translational Medicine*, 17(1), 163. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1901-8>
21. Greber, B. J., Perez-Bertoldi, J. M., Lim, K., Iavarone, A. T., Toso, D. B., & Nogales, E. (2020). The cryoelectron microscopy structure of the human CDK-activating kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009627117>
22. Gurrion, C., Uriostegui, M., & Zurita, M. (2017). Heterochromatin Reduction Correlates with the Increase of the KDM4B and KDM6A Demethylases and the Expression of Pericentromeric DNA during the Acquisition of a Transformed Phenotype. *Journal of Cancer*, 8(14), 2866-2875. <https://doi.org/10.7150/jca.19477>

23. Han, R., Rostami-Yazdi, M., Gerdes, S., & Mrowietz, U. (2012). Triptolide in the treatment of psoriasis and other immune-mediated inflammatory diseases. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 74(3), 424-436. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04221.x>
24. He, Q.-L., Titov, D. V., Li, J., Tan, M., Ye, Z., Zhao, Y., Romo, D., & Liu, J. O. (2015). Covalent Modification of a Cysteine Residue in the XPB Subunit of the General Transcription Factor TFIIH Through Single Epoxide Cleavage of the Transcription Inhibitor Triptolide. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(6), 1859-1863. <https://doi.org/10.1002/anie.201408817>
25. Helmstädter, A. (2013, julio). *Tripterygium wilfordii* Hook. F. &#8211; how a traditional Taiwanese medicinal plant found its way to the West [Text]. Avoxa - Mediengruppe Deutscher Apotheker GmbH. <https://doi.org/info:doi/10.1691/ph.2013.6506>
26. HGNC Guidelines | HUGO Gene Nomenclature Committee. (s. f.). Recuperado 26 de abril de 2020, de <https://www.genenames.org/about/guidelines/>
27. Hirata, H., Bessho, Y., Kokubu, H., Masamizu, Y., Yamada, S., Lewis, J., & Kageyama, R. (2004). Instability of Hes7 protein is crucial for the somite segmentation clock. *Nature Genetics*, 36(7), 750-754. <https://doi.org/10.1038/ng1372>
28. Hou, W., Liu, B., & Xu, H. (2019). Triptolide: Medicinal chemistry, chemical biology and clinical progress. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 176, 378-392. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.032>
29. Huang, M., Lu, J.-J., Huang, M.-Q., Bao, J.-L., Chen, X.-P., & Wang, Y.-T. (2012). Terpenoids: Natural products for cancer therapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 21(12), 1801-1818. <https://doi.org/10.1517/13543784.2012.727395>
30. Huang, Y., Yang, Y., He, Y., & Li, J. (2015). The emerging role of Nemo-like kinase (NLK) in the regulation of cancers. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(12), 9147-9152. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4159-7>

31. Huttlin, E. L., Bruckner, R. J., Paulo, J. A., Cannon, J. R., Ting, L., Baltier, K., Colby, G., Gebreab, F., Gygi, M. P., Parzen, H., Szpyt, J., Tam, S., Zarraga, G., Pontano-Vaites, L., Swarup, S., White, A. E., Schweppe, D. K., Rad, R., Erickson, B. K., ... Harper, J. W. (2017). Architecture of the human interactome defines protein communities and disease networks. *Nature*, 545(7655), 505-509. <https://doi.org/10.1038/nature22366>
32. Iliopoulos, D., Hirsch, H. A., & Struhl, K. (2009). An Epigenetic Switch Involving NF- $\kappa$ B, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 Links Inflammation to Cell Transformation. *Cell*, 139(4), 693-706. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.014>
33. Ishitani, T., & Ishitani, S. (2013). Nemo-like kinase, a multifaceted cell signaling regulator. *Cellular Signalling*, 25(1), 190-197. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.09.017>
34. Ishitani, T., Ninomiya-Tsuji, J., & Matsumoto, K. (2003). Regulation of Lymphoid Enhancer Factor 1/T-Cell Factor by Mitogen-Activated Protein Kinase-Related Nemo-Like Kinase-Dependent Phosphorylation in Wnt/  $\beta$ -Catenin Signaling. *Molecular and cellular biology*, 23, 1379-1389. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.4.1379-1389.2003>
35. Jen, J., & Wang, Y.-C. (2016). Zinc finger proteins in cancer progression. *Journal of Biomedical Science*, 23(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0269-9>
36. Kageyama, R., Ohtsuka, T., & Kobayashi, T. (2007). The Hes gene family: Repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. *Development*, 134(7), 1243-1251. <https://doi.org/10.1242/dev.000786>
37. Kang, S. A., Seol, J. H., & Kim, J. (2005). The conserved WRPW motif of Hes6 mediates proteasomal degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332(1), 33-36. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.089>
38. Kumar, P., & Bansal, M. (2016). Structural and functional analyses of PolyProline-II helices in globular proteins. *Journal of Structural Biology*, 196(3), 414-425. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.09.006>
39. Kupchan, S. M., Court, W. A., Dailey, R. G., Gilmore, C. J., & Bryan, R. F. (1972). Triptolide and triptidiolide, novel antileukemic diterpenoid triepoxides from

- Tripterygium wilfordii. *Journal of the American Chemical Society*, 94(20), 7194-7195. <https://doi.org/10.1021/ja00775a078>
40. Lainé, J., Mocquet, V., & Egly, J. (2006). TFIIH Enzymatic Activities in Transcription and Nucleotide Excision Repair. In *Methods in Enzymology* (Vol. 408, pp. 246-263). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)08015-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)08015-3)
41. Lange, B. M., Fishedick, J. T., Lange, M. F., Srividya, N., Šamec, D., & Poirier, B. C. (2017). Integrative Approaches for the Identification and Localization of Specialized Metabolites in Tripterygium Roots. *Plant Physiology*, 173(1), 456-469. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01593>
42. Lee, Y.-J., Han, D.-H., Pak, Y. K., & Cho, S. (2012). Circadian regulation of low density lipoprotein receptor promoter activity by CLOCK/BMAL1, Hes1 and Hes6. *Experimental & Molecular Medicine*, 44(11), 642-652. <https://doi.org/10.3858/emm.2012.44.11.073>
43. Leuenroth, S. J., Okuhara, D., Shotwell, J. D., Markowitz, G. S., Yu, Z., Somlo, S., & Crews, C. M. (2007). Triptolide is a traditional Chinese medicine-derived inhibitor of polycystic kidney disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(11), 4389-4394. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700499104>
44. Li, N., Yang, L., Qi, X.-K., Lin, Y.-X., Xie, X., He, G.-P., Feng, Q.-S., Liu, L.-R., Xie, X., Zeng, Y.-X., & Feng, L. (2018). BET bromodomain inhibitor JQ1 preferentially suppresses EBV-positive nasopharyngeal carcinoma cells partially through repressing c-Myc. *Cell Death & Disease*, 9(7), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0789-1>
45. Liu, X., Bushnell, D. A., & Kornberg, R. D. (2013). RNA polymerase II transcription: Structure and mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(1), 2-8. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.09.003>
46. Lu, Y., Zhang, Y., Li, L., Feng, X., Ding, S., Zheng, W., Li, J., & Shen, P. (2014). TAB1: A Target of Triptolide in Macrophages. *Chemistry & Biology*, 21(2), 246-256. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.12.009>

47. Lv, H., Jiang, L., Zhu, M., Li, Y., Luo, M., Jiang, P., Tong, S., Zhang, H., & Yan, J. (2019). The genus *Tripterygium*: A phytochemistry and pharmacological review. *Fitoterapia*, 137, 104190. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104190>
48. Ma, B., Hu, T., Li, P., Yuan, Q., Lin, Z., Tu, Y., Li, J., Zhang, X., Wu, X., Wang, X., Huang, L., & Gao, W. (2017). Phylogeographic and phylogenetic analysis for *Tripterygium* species delimitation. *Ecology and Evolution*, 7(20), 8612-8623. <https://doi.org/10.1002/ece3.3344>
49. Maeda, O., Ando, T., Ohmiya, N., Ishiguro, K., Watanabe, O., Miyahara, R., Hibi, Y., Nagai, T., Yamada, K., & Goto, H. (2014). Alteration of gene expression and DNA methylation in drug-resistant gastric cancer. *Oncology Reports*, 31(4), 1883-1890. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3014>
50. Meirson, T., Bomze, D., Kahlon, L., Gil-Henn, H., & Samson, A. O. (2020). A helical lock and key model of polyproline II conformation with SH3. *Bioinformatics*, 36(1), 154-159. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz527>
51. Mermod, N., O'Neill, E. A., Kelly, T. J., & Tjian, R. (1989). The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA binding domain. *Cell*, 58(4), 741-753. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90108-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90108-6)
52. Murai, K., Philpott, A., & Jones, P. H. (2011). Hes6 Is Required for the Neurogenic Activity of Neurogenin and NeuroD. *PLoS ONE*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027880>
53. Nam, S. M., Kim, Y. N., Kim, J. W., Kyeong, D. S., Lee, S. H., Son, Y., Shin, J. H., Kim, J., Yi, S. S., Yoon, Y. S., & Seong, J. K. (2016). Hairy and Enhancer of Split 6 (Hes6) Deficiency in Mouse Impairs Neuroblast Differentiation in Dentate Gyrus Without Affecting Cell Proliferation and Integration into Mature Neurons. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 36(1), 57-67. <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0220-8>
54. Narwani, T. J., Santuz, H., Shinada, N., Melarkode Vattekatte, A., Ghouzam, Y., Srinivasan, N., Gelly, J.-C., & de Brevern, A. G. (2017). Recent advances on



polyproline II. *Amino Acids*, 49(4), 705-713. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2385-6>

55. Noel, P., Hoff, D. D. V., Saluja, A. K., Velagapudi, M., Borazanci, E., & Han, H. (2019). Triptolide and Its Derivatives as Cancer Therapies. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40(5), 327-341. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.03.002>
56. Rimel, J. K., & Taatjes, D. J. (2018). The essential and multifunctional TFIIH complex. *Protein Science*, 27(6), 1018-1037. <https://doi.org/10.1002/pro.3424>
57. Rivard, C., Geller, M., Vogel, R. I., Schnettler, E., Saluja, M., Saluja, A., & Ramakrishnan, S. (2014). Minnelide: A promising new therapy for ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 135(2), 387. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.07.021>
58. Rosales-Aviña, J. A., Torres-Flores, J., Aguilar-Lemarro, A., Gurrola-Díaz, C., Hernández-Flores, G., Ortiz-Lazareno, P. C., Lerma-Díaz, J. M., de Celis, R., González-Ramella, Ó., Barrera-Chaires, E., Bravo-Cuellar, A., & Jave-Suárez, L. F. (2011). MEIS1, PREP1, and PBX4 Are Differentially Expressed in Acute Lymphoblastic Leukemia: Association of MEIS1 Expression with Higher Proliferation and Chemotherapy Resistance. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 112. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-112>
59. Schulte, D., & Geerts, D. (2019). MEIS transcription factors in development and disease. *Development*, 146(16). <https://doi.org/10.1242/dev.174706>
60. Soule, H. D., Maloney, T. M., Wolman, S. R., Peterson, W. D., Brenz, R., McGrath, C. M., Russo, J., Pauley, R. J., Jones, R. F., & Brooks, S. C. (1990). Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Breast Epithelial Cell Line, MCF-10. *Cancer Research*, 50(18), 6075-6086.
61. Soundararajan, R., Sayat, R., Robertson, G. S., & Marignani, P. A. (2009). Triptolide: An inhibitor of a disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10) in cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*, 8(21), 2054-2062. <https://doi.org/10.4161/cbt.8.21.9803>
62. Su, P., Guan, H., Zhao, Y., Tong, Y., Xu, M., Zhang, Y., Hu, T., Yang, J., Cheng, Q., Gao, L., Liu, Y., Zhou, J., Peters, R. J., Huang, L., & Gao, W. (2018).

- Identification and functional characterization of diterpene synthases for triptolide biosynthesis from *Tripterygium wilfordii*. *The Plant Journal*, 93(1), 50-65. <https://doi.org/10.1111/tpj.13756>
63. Sun, H., Ghaffari, S., & Taneja, R. (2007). BHLH-Orange Transcription Factors in Development and Cancer. *Translational Oncogenomics*, 2, 107-120.
64. The Genotype-Tissue Expression (02 de marzo, 2020). Gtex Project was supported by the Common Fund of the Office of the Director of the National Institutes of Health, and by NCI, NHGRI, NHLBI, NIDA, NIMH, and NINDS. Numero de acceso phs000424.v8.p2. Recuperado de <https://www.gtexportal.org/home/gene/FAM222A>
65. The Genotype-Tissue Expression (02 de marzo, 2020). Gtex Project was supported by the Common Fund of the Office of the Director of the National Institutes of Health, and by NCI, NHGRI, NHLBI, NIDA, NIMH, and NINDS. Numero de acceso phs000424.v8.p2. Recuperado de <https://www.gtexportal.org/home/gene/HES6>
66. The Genotype-Tissue Expression (02 de marzo, 2020). Gtex Project was supported by the Common Fund of the Office of the Director of the National Institutes of Health, and by NCI, NHGRI, NHLBI, NIDA, NIMH, and NINDS. Numero de acceso phs000424.v8.p2. Recuperado de <https://www.gtexportal.org/home/gene/ZNF547>
67. The Human Protein Atlas. (02 de marzo, 2020). Cell atlas—HES6—. Recuperado de <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000144485-HES6/cell>
68. The Human Protein Atlas. (0 de marzo, 2020). Cell atlas—FAM222A—. Recuperado de <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000139438-FAM222A/cell>
69. The UniProt Consortium; UniProt: the universal protein knowledgebase. (02 de marzo, 2019). *Nucleic Acids Research*, 46(5), 2699.
70. Titov, D. V., Gilman, B., He, Q.-L., Bhat, S., Low, W.-K., Dang, Y., Smeaton, M., Demain, A. L., Miller, P. S., Kugel, J. F., Goodrich, J. A., & Liu, J. O. (2011). XPB,

- a subunit of TFIIH, is a target of the natural product triptolide. *Nature Chemical Biology*, 7(3), 182-188. <https://doi.org/10.1038/nchembio.522>
71. Uriostegui, M., Aguayo-Ortiz, R., Morales, M., Melchy, E., Rosenstein, Y., Dominguez, L., & Zurita, M. (2020). Disruption of TFIIH activities generates a stress gene expression response and reveals possible new targets against cancer. <https://doi.org/10.1098/rsob.200050>
72. Urrutia, R. (2003). KRAB-containing zinc-finger repressor proteins. *Genome Biology*, 4(10), 231. <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-10-231>
73. Villicaña, C., Cruz, G., & Zurita, M. (2013). The genetic depletion or the triptolide inhibition of TFIIH in p53-deficient cells induces a JNK-dependent cell death in *Drosophila*. *Journal of Cell Science*, 126(11), 2502-2515. <https://doi.org/10.1242/jcs.122721>
74. Wain, H. M., Bruford, E. A., Lovering, R. C., Lush, M. J., Wright, M. W., & Povey, S. (2002). Guidelines for Human Gene Nomenclature. *Genomics*, 79(4), 464-470. <https://doi.org/10.1006/geno.2002.6748>
75. Wang, Q., Xiao, B., Cui, S., Song, H., Qian, Y., Dong, L., An, H., Cui, Y., Zhang, W., He, Y., Zhang, J., Yang, J., Zhang, F., Hu, G., Gong, X., Yan, Z., Zheng, Y., & Wang, X. (2014). Triptolide treatment reduces Alzheimer's disease (AD)-like pathology through inhibition of BACE1 in a transgenic mouse model of AD. *Disease Models & Mechanisms*, 7(12), 1385-1395. <https://doi.org/10.1242/dmm.018218>
76. Wei, Y.-M., Wang, Y.-H., Xue, H.-Q., Luan, Z.-H., Liu, B.-W., & Ren, J.-H. (2019). Triptolide, A Potential Autophagy Modulator. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 25(3), 233-240. <https://doi.org/10.1007/s11655-018-2847-z>
77. Wermuth, P., & Buchberg, A. (2005). Meis1-mediated apoptosis is caspase dependent and can be suppressed by coexpression of HoxA9 in murine and human cell lines. *Blood*, 105, 1222-1230. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0802>

78. Xi, C., Peng, S., Wu, Z., Zhou, Q., & Zhou, J. (2017). Toxicity of triptolide and the molecular mechanisms involved. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 90, 531-541. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.003>
79. Xu, H., & Liu, B. (2019). Triptolide-targeted delivery methods. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 164, 342-351. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.12.058>
80. Yan, P., & Sun, X. (2018). Triptolide: A new star for treating human malignancies. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 14(Supplement), S271-S275. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.235340>
81. Yan, T., Liang, J., Gao, J., Wang, L., Fujioka, H., Alzheimer Disease Neuroimaging Initiative, Zhu, X., & Wang, X. (2020). FAM222A encodes a protein which accumulates in plaques in Alzheimer's disease. *Nature Communications*, 11(1), 411. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13962-0>
82. Zhang, H.-H., Li, S.-Z., Zhang, Z.-Y., Hu, X.-M., Hou, P.-N., Gao, L., Du, R.-L., & Zhang, X.-D. (2014). Nemo-like kinase is critical for p53 stabilization and function in response to DNA damage. *Cell Death & Differentiation*, 21(10), 1656-1663. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.78>
83. Zheng, Y., Zhang, W., & Wang, X. (2012). Triptolide with Potential Medicinal Value for Diseases of the Central Nervous System. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 19(2), 76-82. <https://doi.org/10.1111/cns.12039>
84. Ziaei, S., & Halaby, R. (2016). Immunosuppressive, anti-inflammatory and anti-cancer properties of triptolide: A mini review. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 6(2), 149-164.
85. ZNF547 Gene—GeneCards | ZN547 Protein | ZN547 Antibody. (s. f.). Recuperado 7 de abril de 2020, de <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ZNF547&keywords=ZNF547>

## 13. APÉNDICE

### 13.1 Componentes del medio de crecimiento para la línea celular MCF10A ER-Src

Componente	Medio de crecimiento 0.5µg/ mL de puromicina <sup>a</sup>	Medio de selección 2 µg/ mL de puromicina <sup>a</sup>
DMEM/F12 (1:1) (Invitrogen No. 11039-021)	500 ml	500 ml
Suero de Caballo (Invitrogen No.16050-122)	25 ml	25 ml
EGF (100 µg/ml stock)	100 µl	100 µl
Hidrocortisona (1 mg/ml) <sup>c</sup>	250 µl	250 µl
Toxina del colera (1mg/ml stock) <sup>d</sup>	50 µl	50 µl
Insulina (10 mg/ml stock) <sup>e</sup>	500 µl	500 µl
Pen/Strep (100X solution. Invitrogen No. 15070-063)	5 ml	5 ml
Puromicina	250 µl	1 ml

(1mg/ml stock) <sup>f</sup>		
-----------------------------	--	--

- a) Para cada tipo de medio, pre mezclar los diferentes componentes apropiados y filtrarlos a través de un filtro estéril de 0.22 µm.
- b) EGF (Peptotech, 1mg). Resuspender 100µg/ml en dH2O estéril. Realizar alícuotas y guardarlas a -20°C.
- c) Hidrocortisona (Sigma No. H-0888, frasco con 1g. Resuspender 1mg/ml en etanol. Realizar alícuotas y guardarlas a -20°C.
- d) Toxina del cólera (Sigma No. C-8052, frasco con 2g. Resuspender 1mg/ml en dH2O estéril y dejar en agitación aproximadamente durante 10 min. Realizar alícuotas y guardar a 4°C.
- e) Insulina (Sigma No. I-1882, vial con 100 mg). Resuspender 10 mg/ml en dH2O estéril con 1% de ácido acético glacial, dejar en agitación de 10 a 15 min. Realizar alícuotas y guardar a -20°C.
- f) Puromicina (Calbiochem No Cat. 540411) Resuspender 1mg/ml en dH2O estéril . Realizar alícuotas y guardar a -20°C.

### 13.2 Lista de ortólogos del gen y la proteína FAM222A encontrados en la base de datos de NCBI y OrthoDB.

Gene ID	Gene symbol	Description	Scientific name	Common name	RefSeq Transcript accessions	RefSeq Protein accessions	Curation Status
84915	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Homo sapiens</i>	human	NM_032829.3	NP_116218.2	curated
433940	Fam222a	family with sequence similarity 222, member A	<i>Mus musculus</i>	house mouse	NM_001004180.1	NP_001004180.1	curated
498193	Fam222a	family with sequence similarity 222, member A	<i>Rattus norvegicus</i>	Norway rat	NM_001109067.1	NP_001102537.1	curated
617781	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Bos taurus</i>	cattle	NM_001206865.1	NP_001193794.1	curated
707868	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Macaca mulatta</i>	Rhesus monkey	NM_001194323.2	NP_001181252.1	curated
780041	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Xenopus tropicalis</i>	tropical clawed frog	NM_001079118.1	NP_001072586.1	curated
793922	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Danio rerio</i>	zebrafish	NM_001126454.1	NP_001119926.1	curated
735961	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Pan troglodytes</i>	chimpanzee	XM_001138665.5	XP_001138665.1	model
768548	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Gallus gallus</i>	chicken	XM_025155592.1	XP_025011360.1	model
100028388	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Monodelphis domestica</i>	gray short-tailed opossum	XM_007490422.2	XP_007490484.1	model
100153422	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Sus scrofa</i>	pig	XM_001929174.7	XP_001929209.4	model
100350802	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	rabbit	XM_002723975.3	XP_002724021.1	model
100394879	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Callithrix jacchus</i>	white-tufted-ear marmoset	XM_002752983.3	XP_002753029.1	model
100461169	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Pongo abelii</i>	Sumatran orangutan	XM_024256859.1	XP_024112627.1	model
100476145	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	giant panda	XM_002921237.3	XP_002921283.1	model

10054045 2	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Meleagris gallopavo</i>	turkey	XM_031555910. 1	XP_031411770. 1	model
10059037 7	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Nomascus leucogenys</i>	northern white-cheeked gibbon	XM_030821351. 1	XP_030677211. 1	model
10065605 3	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Loxodonta africana</i>	African savanna elephant	XM_003419357. 2	XP_003419405. 1	model
10071016 1	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Oreochromis niloticus</i>	Nile tilapia	XM_025897085. 1	XP_025752870. 1	model
10072386 2	Fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Cavia porcellus</i>	domestic guinea pig	XM_023560783. 1	XP_023416551. 1	model
10075136 2	Fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Cricetulus griseus</i>	Chinese hamster	XM_003503519. 4	XP_003503567. 1	model
10096173 7	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Otolemur garnettii</i>	small-eared galago	XM_003789897. 3	XP_003789945. 1	model
10098363 9	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Pan paniscus</i>	pygmy chimpanzee	XM_003832502. 1	XP_003832550. 1	model
10101528 7	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Papio anubis</i>	olive baboon	XM_003907131. 5	XP_003907180. 1	model
10103001 2	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Saimiri boliviensis</i>	Bolivian squirrel monkey	XM_003932268. 2	XP_003932317. 1	model
10107901 9	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Takifugu rubripes</i>	torafugu	XM_003974912. 3	XP_003974961. 1	model
10109330 4	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Felis catus</i>	domestic cat	XR_002737222. 1		model
10113525 6	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Gorilla gorilla</i>	western gorilla	XM_004053870. 2	XP_004053918. 1	model
10115730 1	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Oryzias latipes</i>	Japanese medaka	XM_004072604. 4	XP_004072652. 1	model
10127470 4	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Orcinus orca</i>	killer whale	XM_004281390. 2	XP_004281438. 1	model
10131956 3	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Tursiops truncatus</i>	common bottlenose dolphin	XM_019950040. 1	XP_019805599. 1	model
10135081 3	LOC10135081 3	family with sequence similarity 222 member A	<i>Trichechus manatus latirostris</i>	Florida manatee	XM_004378986. 1	XP_004379043. 1	model
10136773 3	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Odobenus rosmarus divergens</i>	Pacific walrus	XM_004416177. 1	XP_004416234. 1	model
10139680 3	LOC10139680 3	family with sequence similarity 222 member A	<i>Ceratotherium simum simum</i>	southern white rhinoceros	XM_004429880. 2	XP_004429937. 1	model
10141467 4	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Dasypus novemcinctus</i>	nine-banded armadillo	XM_012519638. 2	XP_012375092. 1	model
10148026 2	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Maylandia zebra</i>	zebra mbuna	XM_004544543. 2	XP_004544600. 1	model
10153079 4	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Ochotona princeps</i>	American pika	XM_004591924. 1	XP_004591981. 1	model
10158051 0	Fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Octodon degus</i>	degu	XM_004636291. 2	XP_004636348. 1	model
10160640 2	Fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Jaculus jaculus</i>	lesser Egyptian jerboa	XM_004664109. 1	XP_004664166. 1	model
10163099 0	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Condylura cristata</i>	star-nosed mole	XM_004690949. 2	XP_004691006. 1	model
10165015 0	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Echinops telfairi</i>	small Madagascar hedgehog	XM_004709541. 1	XP_004709598. 1	model
10168675 2	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Mustela putorius furo</i>	domestic ferret	XM_004779124. 2	XP_004779181. 1	model
10170707 7	Fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Heterocephalus glaber</i>	naked mole-rat	XM_004843607. 3	XP_004843664. 1	model
10181075 9	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Ficedula albicollis</i>	collared flycatcher	XM_016302083. 1	XP_016157569. 1	model

10182576 2	Fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Mesocricetus auratus</i>	golden hamster	XM_005078942. 3	XP_005078999. 1	model
10192478 6	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Falco peregrinus</i>	peregrine falcon	XM_005236519. 2	XP_005236576. 1	model
10193774 9	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Chrysemys picta</i>	Painted turtle	XM_005298535. 3	XP_005298592. 1	model
10196481 0	Fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Ictidomys tridecemlineatus</i>	thirteen-lined ground squirrel	XM_021720008. 1	XP_021575683. 1	model
10198876 6	Fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Microtus ochrogaster</i>	prairie vole	XM_005344265. 3	XP_005344322. 1	model
10201914 0	Fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Chinchilla lanigera</i>	long-tailed chinchilla	XM_013520493. 1	XP_013375947. 1	model
10203155 8	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Geospiza fortis</i>	medium ground-finch	XM_005424112. 2	XP_005424169. 1	model
10205121 4	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Falco cherrug</i>	Saker falcon	XM_005445155. 2	XP_005445212. 2	model
10209359 7	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Columba livia</i>	rock pigeon	XM_021285157. 1	XP_021140832. 1	model
10210624 2	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Pseudopodoces humilis</i>	Tibetan ground-tit	XM_005524313. 2	XP_005524370. 1	model
10212625 2	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Macaca fascicularis</i>	crab-eating macaque	XM_005572201. 1	XP_005572258. 1	model
10214919 2	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Equus caballus</i>	horse	XM_023646963. 1	XP_023502731. 1	model
10215494 7	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Canis lupus familiaris</i>	dog	XM_022410805. 1	XP_022266513. 1	model
10218141 6	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Capra hircus</i>	goat	XM_018061104. 1	XP_017916593. 1	model
10219770 0	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Pundamilia nyererei</i>		XM_005722209. 1	XP_005722266. 1	model
10221905 9	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Xiphophorus maculatus</i>	southern platyfish	XM_005804030. 2	XP_005804087. 1	model
10226389 7	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Myotis brandtii</i>	Brandt's bat	XM_005863796. 1	XP_005863858. 1	model
10227718 5	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Bos mutus</i>	wild yak	XM_005891515. 1	XP_005891577. 1	model
10230780 3	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Haplochromis burtoni</i>	Burton's mouthbrooder	XM_005940181. 2	XP_005940243. 1	model
10234948 1	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Latimeria chalumnae</i>	coelacanth	XM_006004546. 2	XP_006004608. 1	model
10238747 7	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Alligator sinensis</i>	Chinese alligator	XM_025198428. 1	XP_025054213. 1	model
10239336 2	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Bubalus bubalis</i>	water buffalo	XM_025267475. 1	XP_025123260. 1	model
10248549 5	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Tupaia chinensis</i>	Chinese tree shrew	XM_027769378. 1	XP_027625179. 1	model
10251776 7	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Camelus ferus</i>	Wild Bactrian camel	XM_032471397. 1	XP_032327288. 1	model
10252544 6	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Vicugna pacos</i>	alpaca	XM_006204900. 2	XP_006204962. 1	model
10256691 3	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Alligator mississippiensis</i>	American alligator	XM_019486750. 1	XP_019342295. 1	model
10268664 5	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Lepisosteus oculatus</i>	spotted gar	XM_006640206. 2	XP_006640269. 1	model
10276218 7	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Myotis davidii</i>		XM_015568160. 1	XP_015423646. 1	model
10279859 0	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Neolamprologus brichardi</i>		XM_006784230. 1	XP_006784293. 1	model



10283687 6	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Chrysocloris asiatica</i>	Cape golden mole	XM_006870440. 1	XP_006870502. 1	model
10287448 8	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Elephantulus edwardii</i>	Cape elephant shrew	XM_006894835. 1	XP_006894897. 1	model
10288586 7	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Pteropus alecto</i>	black flying fox	XM_006922149. 3	XP_006922211. 1	model
10290554 2	Fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Peromyscus maniculatus bairdii</i>	prairie deer mouse	XM_006993939. 2	XP_006994001. 1	model
10294406 6	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Chelonia mydas</i>	Green sea turtle	XM_007058339. 2	XP_007058401. 1	model
10297163 8	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Panthera tigris altaica</i>	Amur tiger	XM_007092351. 1	XP_007092413. 1	model
10298019 4	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Physeter catodon</i>	sperm whale	XM_024121079. 2	XP_023976847. 1	model
10300422 8	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Balaenoptera acutorostrata scammoni</i>		XM_007180121. 2	XP_007180183. 1	model
10304159 2	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Astyanax mexicanus</i>	Mexican tetra	XM_007233489. 3	XP_007233551. 2	model
10306687 6	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Python bivittatus</i>	Burmese python	XM_007441941. 3	XP_007442003. 1	model
10308877 6	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Lipotes vexillifer</i>	Yangtze River dolphin	XM_007448221. 1	XP_007448283. 1	model
10311549 0	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Erinaceus europaeus</i>	western European hedgehog	XM_007525245. 2	XP_007525307. 1	model
10314288 6	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Poecilia formosa</i>	Amazon molly	XM_007559176. 2	XP_007559238. 1	model
10318402 9	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Callorhynchus milii</i>	elephant shark	XM_007901851. 1	XP_007900042. 1	model
10320919 0	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Orycteropus afer afer</i>		XM_007954973. 1	XP_007953164. 1	model
10323909 1	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Chlorocebus sabaeus</i>	green monkey	XM_008004643. 1	XP_008002834. 1	model
10330196 5	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Eptesicus fuscus</i>	big brown bat	XM_008158968. 2	XP_008157190. 1	model
10337489 0	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Stegastes partitus</i>	bicolor damselfish	XM_008305043. 1	XP_008303265. 1	model
10339731 5	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	tongue sole	XM_008335532. 3	XP_008333754. 1	model
10347033 7	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Poecilia reticulata</i>	guppy	XM_008418709. 2	XP_008416931. 1	model
10352919 0	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Calypte anna</i>	Anna's hummingbird	XM_030460909. 1	XP_030316769. 1	model
10354327 9	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Equus przewalskii</i>	Przewalski's horse	XM_008510169. 1	XP_008508391. 1	model
10360468 0	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Galeopterus variegatus</i>	Sunda flying lemur	XM_008589253. 1	XP_008587475. 1	model
10361607 0	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Corvus brachyrhynchos</i>	American crow	XM_008634200. 2	XP_008632422. 1	model
10374670 2	Fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Nannospalax galili</i>	Upper Galilee mountains blind mole rat	XM_008848977. 2	XP_008847199. 1	model
10381812 3	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Serinus canaria</i>	Common canary	XM_030233064. 1	XP_030088924. 1	model
10390283 1	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Aptenodytes forsteri</i>	emperor penguin	XM_019473283. 1	XP_019328828. 1	model
10392568 9	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Pygoscelis adeliae</i>	Adelie penguin	XM_009334436. 1	XP_009332711. 1	model
10401909 9	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Nipponia nippon</i>	crested ibis	XM_009472327. 1	XP_009470602. 1	model

10405891 0	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Cuculus canorus</i>	common cuckoo	XM_009560496. 1	XP_009558791. 1	model
10428229 6	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Charadrius vociferus</i>	killdeer	XM_009880379. 2	XP_009878681. 1	model
10430850 9	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Picoides pubescens</i>	Downy woodpecker	XM_009909714. 1	XP_009908016. 1	model
10433637 3	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Opisthocomus hoazin</i>		XM_009942204. 1	XP_009940506. 1	model
10438804 1	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Chaetura pelagica</i>	chimney swift	XM_009996849. 1	XP_009995151. 1	model
10453864 6	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Mesitornis unicolor</i>	brown roatelo	XM_010181913. 1	XP_010180215. 1	model
10467496 9	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Rhinopithecus roxellana</i>	golden snub-nosed monkey	XM_010379447. 2	XP_010377749. 1	model
10484083 2	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Haliaeetus leucocephalus</i>	bald eagle	XM_010582064. 1	XP_010580366. 1	model
10484831 4	Fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Fukomys damarensis</i>	Damara mole-rat	XM_010604171. 1	XP_010602473. 1	model
10492125 7	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Larimichthys crocea</i>	large yellow croaker	XM_010733735. 3	XP_010732037. 3	model
10494502 4	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Notothenia coriiceps</i>	black rockcod	XM_010770651. 1	XP_010768953. 1	model
10498020 5	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Bison bison bison</i>		XM_010828844. 1	XP_010827146. 1	model
10501444 1	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Esox lucius</i>	northern pike	XM_010876755. 4	XP_010875057. 1	model
10510537 3	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Camelus dromedarius</i>	Arabian camel	XM_031442896. 1	XP_031298756. 1	model
10530394 8	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Pteropus vampyrus</i>	large flying fox	XM_011377817. 2	XP_011376119. 1	model
10549344 2	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Macaca nemestrina</i>	pig-tailed macaque	XM_011761091. 2	XP_011759393. 1	model
10550761 5	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Colobus angolensis palliatu</i>		XM_011936162. 1	XP_011791552. 1	model
10555224 0	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Mandrillus leucophaeus</i>	drill	XM_011997842. 1	XP_011853232. 1	model
10557321 5	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Cercocebus atys</i>	sooty mangabey	XM_012032478. 1	XP_011887868. 1	model
10572863 6	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Aotus nancymae</i>	Ma's night monkey	XM_012469113. 1	XP_012324536. 1	model
10582328 3	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Propithecus coquereli</i>	Coquerel's sifaka	XM_012660428. 1	XP_012515882. 1	model
10586688 3	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Microcebus murinus</i>	gray mouse lemur	XM_012756507. 2	XP_012611961. 1	model
10590287 4	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Clupea harengus</i>	Atlantic herring	XM_012830555. 2	XP_012686009. 1	model
10592699 5	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Fundulus heteroclitus</i>	mummichog	XM_012863569. 2	XP_012719023. 1	model
10598434 2	Fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Dipodomys ordii</i>	Ord's kangaroo rat	XM_013014507. 1	XP_012869961. 1	model
10603139 3	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Anser cygnoides domesticus</i>		XM_013173765. 1	XP_013029219. 1	model
10652170 4	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Austrofundulus limnaeus</i>		XM_014014387. 1	XP_013869841. 1	model
10655685 2	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Thamnophis sirtalis</i>		XM_014075872. 1	XP_013931347. 1	model
10658010 3	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Salmo salar</i>	Atlantic salmon	XM_014160773. 1	XP_014016248. 1	model

106629887	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Zonotrichia albicollis</i>	white-throated sparrow	XM_014272770.2	XP_014128245.1	model
106848090	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Equus asinus</i>	ass	XM_014867809.1	XP_014723295.1	model
106852344	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Sturnus vulgaris</i>	Common starling	XM_014874874.1	XP_014730360.1	model
106886800	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Calidris pugnax</i>	ruff	XM_014940021.1	XP_014795507.1	model
106918385	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Poecilia mexicana</i>		XM_014988093.1	XP_014843579.1	model
106944549	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Poecilia latipinna</i>	sailfin molly	XM_015027593.1	XP_014883079.1	model
106979657	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Acinonyx jubatus</i>	cheetah	XM_027044062.1	XP_026899863.1	model
107097265	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Cyprinodon variegatus</i>	sheepshead minnow	XM_015394345.1	XP_015249831.1	model
107112173	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Gekko japonicus</i>		XM_015413257.1	XP_015268743.1	model
107154523	Fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Marmota marmota marmota</i>	Alpine marmot	XM_015500156.1	XP_015355642.1	model
107211500	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Parus major</i>	Great Tit	XM_033518187.1	XP_033374078.1	model
107287300	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>		XM_015815795.1	XP_015671281.1	model
107321515	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Coturnix japonica</i>	Japanese quail	XM_015878496.2	XP_015733982.1	model
107393964	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Nothobranchius furzeri</i>	turquoise killifish	XM_015972625.1	XP_015828111.1	model
107500136	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Rousettus aegyptiacus</i>	Egyptian rousette	XM_016125041.1	XP_015980527.1	model
107528463	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Miniopterus natalensis</i>		XM_016201545.1	XP_016057031.1	model
107654618	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Sinocyclocheilus anshuiensis</i>		XM_016441774.1	XP_016297260.1	model
107752139	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Sinocyclocheilus rhinoceros</i>		XM_016568017.1	XP_016423503.1	model
108234606	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	mangrove rivulus	XM_025005436.1	XP_024861204.1	model
108255568	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Ictalurus punctatus</i>	channel catfish	XM_017451623.1	XP_017307112.1	model
108313333	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Cebus capucinus imitator</i>		XM_017541681.1	XP_017397170.1	model
108392451	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Manis javanica</i>	Malayan pangolin	XM_017652714.1	XP_017508203.1	model
108434289	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Pygocentrus nattereri</i>	red-bellied piranha	XM_017709309.1	XP_017564798.1	model
108497094	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Lepidothrix coronata</i>	blue-crowned manakin	XM_017814454.1	XP_017669943.1	model
108534373	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Rhinopithecus bieti</i>	black snub-nosed monkey	XM_017879693.1	XP_017735182.1	model
108790470	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Nanorana parkeri</i>		XM_018560739.1	XP_018416241.1	model
108878612	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Lates calcarifer</i>	barramundi perch	XM_018669485.1	XP_018525001.1	model
108932568	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Scleropages formosus</i>	Asian bonytongue	XM_018749056.2	XP_018604572.2	model
109277468	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Panthera pardus</i>	leopard	XM_019467170.1	XP_019322715.1	model

10929053 0	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Gavialis gangeticus</i>	Gharial	XM_019507171. 1	XP_019362716. 1	model
10931269 4	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Crocodylus porosus</i>	Australian saltwater crocodile	XM_019538854. 1	XP_019394399. 1	model
10938621 1	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Hipposideros armiger</i>	great roundleaf bat	XM_019649154. 1	XP_019504699. 1	model
10951152 2	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Hippocampus comes</i>	tiger tail seahorse	XM_019862686. 1	XP_019718245. 1	model
10957150 1	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Bos indicus</i>	zebu cattle	XM_019978023. 1	XP_019833582. 1	model
10963820 9	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Japanese flounder	XM_020101081. 1	XP_019956640. 1	model
10968807 3	Fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Castor canadensis</i>	American beaver	XM_020166311. 1	XP_020021900. 1	model
10989566 3	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	coho salmon	XM_020489547. 2	XP_020345136. 1	model
10991485 6	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Rhincodon typus</i>	whale shark	XM_020514470. 1	XP_020370059. 1	model
10995696 3	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Monopterus albus</i>	swamp eel	XM_020594481. 1	XP_020450137. 1	model
10999597 1	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Labrus bergylla</i>	ballan wrasse	XM_020649884. 2	XP_020505540. 1	model
11008343 1	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Pogona vitticeps</i>	central bearded dragon	XM_020801886. 1	XP_020657545. 1	model
11014633 4	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Odocoileus virginianus texanus</i>		XM_020907123. 1	XP_020762782. 1	model
11015675 6	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	great blue-spotted mudskipper	XM_020920973. 1	XP_020776632. 1	model
11020357 1	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Phascolarctos cinereus</i>	koala	XM_020980078. 1	XP_020835737. 1	model
11029455 4	Fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Mus caroli</i>	Ryukyu mouse	XM_021162865. 2	XP_021018524. 1	model
11031297 4	Fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Mus pahari</i>	shrew mouse	XM_021186964. 1	XP_021042623. 1	model
11040651 5	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Numida meleagris</i>	helmeted guineafowl	XM_021413108. 1	XP_021268783. 1	model
11047811 0	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Lonchura striata domestica</i>	Bengalese finch	XM_021544557. 1	XP_021400232. 1	model
11059252 7	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Neomonachus schauinslandi</i>	Hawaiian monk seal	XM_021703543. 1	XP_021559218. 1	model
11095408 4	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Acanthochromis polyacanthus</i>	spiny chromis	XM_022198393. 1	XP_022054085. 1	model
11115650 6	LOC11115650 6	family with sequence similarity 222 member A	<i>Enhydra lutris kenyoni</i>		XM_022517445. 1	XP_022373153. 1	model
11118813 3	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Delphinapterus leucas</i>	beluga whale	XM_022600341. 1	XP_022456049. 1	model
11123153 9	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Seriola dumerili</i>	greater amberjack	XM_022758678. 1	XP_022614399. 1	model
11153382 3	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Ptilocolobus tephrosceles</i>	Ugandan red Colobus	XM_023200521. 3	XP_023056289. 2	model
11156831 2	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Amphiprion ocellaris</i>	clown anemonefish	XM_023269904. 1	XP_023125672. 1	model
11166025 0	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Seriola lalandi dorsalis</i>		XM_023413448. 1	XP_023269216. 1	model
11185491 3	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Paramormyrops kingsleyae</i>		XM_023833407. 1	XP_023689175. 1	model
11193672 3	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Cyanistes caeruleus</i>	blue tit	XM_023937844. 1	XP_023793612. 1	model

11195793 5	<i>fam222a</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Salvelinus alpinus</i>	Arctic char	XM_023979043. 1	XP_023834811. 1	model
11210421 6	<i>FAM222A</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Terrapene carolina triunguis</i>	Three-toed box turtle	XM_026656857. 1	XP_026512642. 1	model
11214857 9	<i>fam222a</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Oryzias melastigma</i>	Indian medaka	XM_024275813. 1	XP_024131581. 1	model
11226328 3	<i>fam222a</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Chinook salmon	XM_024439373. 1	XP_024295141. 1	model
11231080 6	<i>FAM222A</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Desmodus rotundus</i>	common vampire bat	XM_024567110. 1	XP_024422878. 1	model
11239731 3	<i>FAM222A</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Neophocaena asiaorientalis asiaorientalis</i>	Yangtze finless porpoise	XM_024741490. 1	XP_024597258. 1	model
11263458 6	<i>FAM222A</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Theropithecus gelada</i>	gelada	XM_025402193. 1	XP_025257978. 1	model
11267670 6	<i>FAM222A</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Canis lupus dingo</i>	dingo	XM_025474264. 1	XP_025330049. 1	model
11283719 4	<i>FAM222A</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Callorhinus ursinus</i>	northern fur seal	XM_025889366. 1	XP_025745151. 1	model
11287044 8	<i>FAM222A</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Puma concolor</i>	puma	XM_025933592. 1	XP_025789377. 1	model
11291048 4	<i>FAM222A</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Vulpes vulpes</i>	red fox	XM_025986624. 1	XP_025842409. 1	model
11294520 7	<i>FAM222A</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Nothoprocta perdicaria</i>		XM_026036745. 1	XP_025892530. 1	model
11296338 6	<i>FAM222A</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Apteryx rowi</i>	Okarito brown kiwi	XM_026060374. 1	XP_025916159. 1	model
11299178 1	<i>FAM222A</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Dromaius novaehollandiae</i>	emu	XM_026114535. 1	XP_025970320. 1	model
11303319 2	<i>fam222a</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Astatotilapia calliptera</i>	eastern happy	XM_026186667. 1	XP_026042452. 1	model
11309606 9	<i>fam222a</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Carassius auratus</i>	goldfish	XM_026261459. 1	XP_026117244. 1	model
11313949 4	<i>fam222a</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Mastacembelus armatus</i>	zig-zag eel	XM_026322788. 1	XP_026178573. 1	model
11315098 5	<i>fam222a</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Anabas testudineus</i>	climbing perch	XM_026343767. 1	XP_026199552. 1	model
11319703 8	<i>Fam222a</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Urocitellus parryii</i>	Arctic ground squirrel	XM_026409212. 1	XP_026264997. 1	model
11326709 3	<i>FAM222A</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Ursus arctos horribilis</i>		XM_026515082. 1	XP_026370867. 1	model
11342394 2	<i>FAM222A</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Notechis scutatus</i>	mainland tiger snake	XM_026685517. 1	XP_026541302. 1	model
11344859 2	<i>FAM222A</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Pseudonaja textilis</i>		XM_026719302. 1	XP_026575087. 1	model
11352498 7	<i>fam222a</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	striped catfish	XM_026911394. 1	XP_026767195. 1	model
11358812 1	<i>fam222a</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Electrophorus electricus</i>	electric eel	XM_027027174. 1	XP_026882975. 1	model
11362976 5	<i>FAM222A</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>	Pacific white-sided dolphin	XM_027124506. 1	XP_026980307. 1	model
11364746 4	<i>fam222a</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Tachysurus fulvidraco</i>	yellow catfish	XM_027154187. 1	XP_027009988. 1	model
11390740 1	<i>FAM222A</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Bos indicus x Bos taurus</i>	hybrid cattle	XM_027566528. 1	XP_027422329. 1	model
11391336 7	<i>FAM222A</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Zalophus californianus</i>	California sea lion	XM_027577666. 1	XP_027433467. 1	model
11395133 0	<i>FAM222A</i>	family with sequence similarity 222 member A	<i>Corapipo altera</i>	White-ruffed manakin	XM_027652199. 1	XP_027508000. 1	model

11397050 2	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Neopelma chrysocephalum</i>	safron-crested tyrant-manakin	XM_027689502. 1	XP_027545303. 1	model
11398275 5	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Pipra filicauda</i>	Wire-tailed manakin	XM_027711257. 1	XP_027567058. 1	model
11404306 8	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Vombatus ursinus</i>	common wombat	XM_027861970. 1	XP_027717771. 1	model
11406268 0	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Empidonax traillii</i>	willow flycatcher	XM_027894396. 1	XP_027750197. 1	model
11408185 1	Fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Marmota flaviventris</i>	yellow-bellied marmot	XM_027923340. 1	XP_027779141. 1	model
11410882 9	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Ovis aries</i>	sheep	XM_027956637. 1	XP_027812438. 1	model
11415445 8	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Xiphophorus couchianus</i>	Monterrey platyfish	XM_028033558. 1	XP_027889359. 1	model
11421916 7	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Eumetopias jubatus</i>	Steller sea lion	XM_028116665. 1	XP_027972466. 1	model
11444198 8	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Parambassis ranga</i>	Indian glassy fish	XM_028415209. 1	XP_028271010. 1	model
11447042 9	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Gouania willdenowi</i>	blunt-snouted clingfish	XM_028458636. 1	XP_028314437. 1	model
11450989 1	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Phyllostomus discolor</i>	pale spear-nosed bat	XM_028528479. 1	XP_028384280. 1	model
11455591 8	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Perca flavescens</i>	yellow perch	XM_028578686. 1	XP_028434487. 1	model
11458246 1	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Podarcis muralis</i>	Common wall lizard	XM_028703499. 1	XP_028559332. 1	model
11466869 9	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Erpetoichthys calabaricus</i>	reedfish	XM_028824591. 1	XP_028680424. 1	model
11468132 5	Fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Peromyscus leucopus</i>	white-footed mouse	XM_028854773. 1	XP_028710606. 1	model
11479906 4	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Denticeps clupeioides</i>	denticle herring	XM_028995242. 1	XP_028851075. 1	model
11480608 6	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	platypus	XM_029049110. 1	XP_028904943. 1	model
11486219 3	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Betta splendens</i>	Siamese fighting fish	XM_029162292. 1	XP_029018125. 1	model
11489186 2	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Monodon monoceros</i>	narwhal	XM_029216322. 1	XP_029072155. 1	model
11501353 9	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Cottoperca gobio</i>		XM_029439918. 1	XP_029295778. 1	model
11504853 7	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Echeneis naucrates</i>	live sharksucker	XM_029510076. 1	XP_029365936. 1	model
11510073 2	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Rhinatrema bivittatum</i>	two-lined caecilian	XM_029619526. 1	XP_029475386. 1	model
11513976 9	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Oncorhynchus nerka</i>	sockeye salmon	XM_029677521. 1	XP_029533381. 1	model
11519981 0	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Salmo trutta</i>	river trout	XM_029762259. 1	XP_029618119. 1	model
11527796 5	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Suricata suricatta</i>	meerkat	XM_029922383. 1	XP_029778243. 1	model
11534575 9	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Aquila chrysaetos chrysaetos</i>		XM_030025104. 1	XP_029880964. 1	model
11536547 0	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Myripristis murdjan</i>	pinecone soldierfish	XM_030060492. 1	XP_029916352. 1	model
11539862 6	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Salarias fasciatus</i>	jewelled blenny	XM_030105486. 1	XP_029961346. 1	model
11542587 7	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Sphaeramia orbicularis</i>	orbiculate cardinalfish	XM_030143710. 1	XP_029999570. 1	model

11548090 2	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Microcaecilia unicolor</i>		XM_030219886. 1	XP_030075746. 1	model
11549736 2	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Taeniopygia guttata</i>	zebra finch	XM_030285620. 2	XP_030141480. 2	model
11552849 1	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Lynx canadensis</i>	Canada lynx	XM_030336642. 1	XP_030192502. 1	model
11554125 8	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Gadus morhua</i>	Atlantic cod	XM_030352935. 1	XP_030208795. 1	model
11558218 9	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Sparus aurata</i>	gilthead seabream	XM_030417999. 1	XP_030273859. 1	model
11561435 4	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Strigops habroptila</i>	Kakapo	XM_030501097. 1	XP_030356957. 1	model
11566108 8	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Gopherus evgoodei</i>	Goodes thornscrub tortoise	XM_030583216. 1	XP_030439076. 1	model
11578567 5	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Archocentrus centrarchus</i>	flier cichlid	XM_030737461. 1	XP_030593321. 1	model
11582721 3	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Chanos chanos</i>	milkfish	XM_030791023. 1	XP_030646883. 1	model
11585539 1	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Globicephala melas</i>	long-finned pilot whale	XM_030860607. 1	XP_030716467. 1	model
11590973 2	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Camarhynchus parvulus</i>		XM_030959261. 1	XP_030815121. 1	model
11605662 9	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Sander lucioperca</i>	pike-perch	XM_031308844. 1	XP_031164704. 1	model
11606822 5	Fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Mastomys coucha</i>	southern multimammate mouse	XM_031337496. 1	XP_031193356. 1	model
11622853 8	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Phasianus colchicus</i>	Ring-necked pheasant	XM_031592436. 1	XP_031448296. 1	model
11633247 1	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Oreochromis aureus</i>		XM_031755443. 1	XP_031611303. 1	model
11638851 7	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Anarrhichthys ocellatus</i>	wolf-eel	XM_031856477. 1	XP_031712337. 1	model
11642084 7	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Sarcophilus harrisii</i>	Tasmanian devil	XM_031948786. 1	XP_031804646. 1	model
11645300 2	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Corvus moneduloides</i>	New Caledonian crow	XM_032127977. 1	XP_031983868. 1	model
11647796 0	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Hylobates moloch</i>	silvery gibbon	XM_032168739. 1	XP_032024630. 1	model
11649620 6	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Aythya fuligula</i>	tufted duck	XM_032199119. 1	XP_032055010. 1	model
11651651 6	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Thamnophis elegans</i>	Western terrestrial garter snake	XM_032229047. 1	XP_032084938. 1	model
11656657 5	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Sapajus apella</i>	Tufted capuchin	XM_032301137. 1	XP_032157028. 1	model
11657193 7	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Mustela erminea</i>	ermine	XM_032310471. 1	XP_032166362. 1	model
11662799 7	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Phoca vitulina</i>	harbor seal	XM_032398011. 1	XP_032253902. 1	model
11668934 3	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Etheostoma spectabile</i>	orangethroat darter	XM_032515883. 1	XP_032371774. 1	model
11672957 3	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Xiphophorus hellerii</i>	green swordtail	XM_032578211. 1	XP_032434102. 1	model
11673895 7	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Phocoena sinus</i>	vaquita	XM_032602900. 1	XP_032458791. 1	model
11679592 7	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Chiroxiphia lanceolata</i>	lance-tailed manakin	XM_032706072. 1	XP_032561963. 1	model
11683947 3	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Chelonoidis abingdonii</i>	Abingdon island giant tortoise	XM_032805435. 1	XP_032661326. 1	model

11686100 2	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Lontra canadensis</i>	Northern American river otter	XM_032847415.1	XP_032703306.1	model
11688547 7	Fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Rattus rattus</i>	black rat	XM_032886763.1	XP_032742654.1	model
11695886 7	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Tyto alba</i>	Barn owl	XM_032981656.1	XP_032837547.1	model
11698760 4	fam222a	family with sequence similarity 222 member A	<i>Amblyraja radiata</i>	thorny skate	XM_033043778.1	XP_032899669.1	model
11700465 8	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Catharus ustulatus</i>	Swainson's thrush	XM_033075622.1	XP_032931513.1	model
11701769 5	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	greater horseshoe bat	XM_033098191.1	XP_032954082.1	model
11705839 6	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Lacerta agilis</i>		XM_033169553.1	XP_033025444.1	model
11708943 3	FAM222A	family with sequence similarity 222 member A	<i>Trachypitecus francoisi</i>	Francois's langur	XM_033220682.1	XP_033076573.1	model

### 13.3 Secuencias en formato FASTA obtenidas de NCBI y utilizadas para realizar los alineamientos múltiples.

>gi|283135124|ref|NP\_116218.2| protein FAM222A [Homo sapiens]

MLACLQRTQNAPGQHLACPSKSLELRKCEAVASAMHSSRYPSPAELDAYAEKVANSPLSIKIFP  
TNIRVPQHKHLSRTVNGYDTSGQRYSPYPQHTAGYQGLLAIVKAAVSSSSTAAPAGPAKSVLK  
SAEGKRTKLSAAVQVGIAPYPVPSTLGPLAYPKPPEAPAPPGLPAAATAASVIPLPGRGLPLP  
PSNLPSIHSLLYQLNQQCQAPGAAPPACQGMaipHPSPAKHGPVPSFPSMAYSAAAGLPDCRK  
GTELGQGATQALTLAGAAKPAGYADSGLDYLLWPQKPPPPPPQPLRAYSGSTVASKSPEACG  
GRAYERASGSPLNCGVGLPTSFTVGQYFAAPWNSVLVTPTSDCYNPAAAVVTELGPGAARE  
LAGPPADALSGLPSKSVCNTSVLSSSLQSLEYLINDIRPPCIKEQMLGKGYETVAVPRLLDHQHA  
HIRLPVYR

>gi|332309223|ref|NP\_001193794.1| FAM222A gene product [Bos taurus]

MLACLQRTQNAPGQHLACPTKSLELRKCETVASSMHSSRYPSPAELDAYAEKVANSPLSIKIFP  
TNIRVPQHKHLSRTVNGYDTSGQRYSPYPPHTAGYQGLLAIVKAAVSSSSSAAAPAGPAKSVL  
KSAEGKRTKLSAAVQVGVAPYPAPSTLGPLAYPKPPEVPAPPGLPAAAAPAAAVIPLPGRGL  
PLPPSNLPSIHSLLYQLHQQCQAPGAAPAACQAVPGPPPSPAKHGPVPGFPRRTAYSATAGPPE  
CRKGAELGQGSTPAALTLAGAAKPAGYADGGLDYLLWPQKPPPPPPPPPPQPLRAYGGGALAS  
KSPEACGGRAYERASGSPLNCGVGLPASFTVGQYFAAPWNSVLVTPTSDCYNPAAAAAAAAA  
AAAAGTELGPGAARELAGPPAETLSGLPSKSVCNTAVLSSSLQSLEYLINDIRPPCIKERMLGK  
GYETVAVPRLLDHQHAHIRLPVYR



>gi|51921355|ref|NP\_001004180.1| protein FAM222A [Mus musculus]

MLACLQRTQNPPGQHLACPSKSLDLRKCESVASSMHSSRYPSPAELDAYAEKVANSPLSIKIFP  
TNIRVPQHKHLSRTVNGYDTSGQRYSYPQHTAGYQGLLAIVKAAVSSSAHAPAGHPKSVLKS  
VEGKRTLSPATVQVGIAPYPVPSTLGPLAYPKPEAPAPPPSLPAAATATSVIPLPGRGLPLPP  
SNLPSIHSILYQLNQCCQAPGAAPSACQGVAVPHPSPAKHGVPVSFPNLAYSATAGLPDCRKG  
TELSQGATPALTLGATKPAGYAEGGLDYLLWPQKPPPPPPQPLRAYSSSTVAGKSQSPEICG  
GRAFERANGSPHNCGMGLPGSFTVGQYFAAPWNSVLVTPTSDCYNPAAAAVVTELAPGAAR  
ELAGPPGDVLSGLTSKSVCNTAVLSSSLQSLEYLINDIRPPCIKEQMLGKGYETVAVPRLLDHQ  
HAHIRLPVYR

>gi|157818309|ref|NP\_001102537.1| Fam222a gene product [Rattus norvegicus]

MLACLQRTQNPPGQHLCPSKSLELRKCESVASSMPSSRYPSPAELDAYAEKVANSPLSIKIFP  
TNIRVPQHKHLSRTVNGYDTSGQRYPNPYPQHTTGQGLLAIVKAAVSSTAATPAGHTKSVLKS  
VEGKRTLSPATVQVGIAPYPVPSTLGPLAYPKPEAPAPPPNLAAAATATSVIPLPGRGLPLPP  
SNLPSIHSILYQLNQCCQAPGVAPSACQGVAVPHPSPAKHGVPVSFPRVAYSATAGLPDCRKG  
TELSQGATPALTLGATKPAGYSEGGLDYLLWPQKPPPPPPQPLRAYGSSSTVASKSPETCSG  
RAFERANGSPHNCGMGLPGGFTVGQYFAAPWNSVLVTPTSDCYNAAAAVVTELPGAARE  
LAGPPVDTLGSLTSKSVCNTAVLSSSLQSLEYLINDIRPPCIKEQMLGKGYETVAVPRLLDHQHA  
HIRLPVYR

>gi|187607940|ref|NP\_001119926.1| protein FAM222A [Danio rerio]

MLACLQRRQNPAHQHNPVAVCSSSSSKSLEPTQHINRKCELTVPMPSPRYPSAAELDAYAQKTA  
SSPLSIKIFPTNIRVPQHKHLNRTVNGYDTTGQRYSYPHHTGGYQGLLAIVKVSSSSSSSCSS  
FVPSAKGVLKNSGRRTKLSPAQIAVAPYPPNSSTLGHCCHGQIVYHTGPPKPPEATTLSVPPN  
VTVAGSVIPVAGGRGLNLPPQSNLPSIQSIYQINQHCQAQALQQVCQNGTSTGPPNPSPSKQG  
TTNSSGGTYVTGVAPQGNMPYSGTVIPGQNGEVLKAGVYPEGMDYLLWQKQHHHQQQQA  
VLRMYSGGSGGGGAISKSPETCGPVGSIMLGGAQVSSSRGYPMTASTSGGGGLEKVSSSPLN  
CVGMHGNFSVGQYFAPPWNSVLVTPDSDCYNPQELPGATTTAGPVTGHRELGFPHHHQHHPH  
HHHHHHHHQHPPIDSTGGLCCSLPSKSLCNTSVLSSSLQSLEYLINDIHPPCIKEQMLGK  
GYETVSVPRLLDHQHAHIRLPVYR

>gi|118404802|ref|NP\_001072586.1| protein FAM222A [Xenopus tropicalis]

MLACLQRTQNPPVKHVICANKSIEPRKCETATPMQSARYPSPAELDAYAQKVANNPLTIKIFPTN  
IRVPQHKHLNRTVNGYDTTGQRYSPYPMHTGGYQGLLAIVKSASKSVVKNPEGKRTKISSAQA  
GVAPYPLSSTLTQSQNCNGQLSYLGSQKHLDPVPPNVTVAASVIPLSSRNALQQSNLPSIQS  
IIYQINQQCQAQASHQACQG VVVTNSSPSKQGMANGFTSMTGNAAAYSGTVLQDCRGGSELA  
LGSAPVVTKTGSYQEGMDYLIWQQKQQQLRIYSGGSGGGGAISKSPEVCPGVPRTYTLASAV  
EKVSSSPLNCVGMHGNFSVGQYFAPPWNSILVTPNSDCYNPQELANGHRDLGVHPSDGLTSI  
PSKTLCNTSILSSSLQSLEYLINDIHPPCIKEQMLGKGYETVSVPRLLDHQHAHIRLPIYR

#### ***13.4 Composición detallada de aminoácidos de ortólogos de la proteína FAM222A***

Especie		<i>Homo sapiens</i>		<i>Bos taurus</i>		<i>Mus musculus</i>		<i>Rattus novergicus</i>		<i>Danio rerio</i>		<i>Xenopus tropicalis</i>	
Aminoácido		#	%	#	%	#	%	#	%	#	%	#	%
Alanina	(A)	64	14.20%	79	16.90%	55	12.10%	51	11.30%	28	5.30%	32	7.30%
Arginina	(R)	17	3.80%	19	4.10%	17	3.80%	18	4.00%	16	3.00%	15	3.40%
Asparagina	(N)	11	2.40%	10	2.10%	13	2.90%	14	3.10%	23	4.40%	25	5.70%
Aspartato	(D)	9	2.00%	7	1.50%	9	2.00%	8	1.80%	8	1.50%	10	2.30%
Cisteína	(C)	11	2.40%	11	2.40%	11	2.40%	11	2.40%	14	2.70%	12	2.70%
Glutamina	(Q)	21	4.60%	18	3.90%	21	4.60%	20	4.40%	37	7.00%	35	8.00%
Glutamato	(E)	14	3.10%	16	3.40%	14	3.10%	15	3.30%	14	2.70%	12	2.70%
Glicina	(G)	35	7.70%	40	8.60%	35	7.70%	35	7.70%	52	9.90%	34	7.70%
Histidina	(H)	11	2.40%	11	2.40%	14	3.10%	12	2.70%	37	7.00%	13	3.00%
Isoleucina	(I)	12	2.70%	10	2.10%	13	2.90%	12	2.70%	20	3.80%	23	5.20%
Leucina	(L)	45	10.00%	45	9.60%	44	9.70%	43	9.50%	39	7.40%	36	8.20%
Lisina	(K)	19	4.20%	19	4.10%	19	4.20%	19	4.20%	18	3.40%	20	4.60%
Metionina	(M)	5	1.10%	3	0.60%	4	0.90%	4	0.90%	9	1.70%	8	1.80%
Fenilalanina	(F)	4	0.90%	4	0.90%	5	1.10%	5	1.10%	5	0.90%	4	0.90%
Prolina	(P)	63	13.90%	71	15.20%	63	13.90%	62	13.70%	56	10.60%	35	8.00%
Serina	(S)	45	10.00%	40	8.60%	46	10.20%	44	9.70%	63	12.00%	49	11.20%
Treonina	(T)	20	4.40%	20	4.30%	23	5.10%	30	6.60%	32	6.10%	26	5.90%
Triptófano	(W)	2	0.40%	2	0.40%	2	0.40%	2	0.40%	2	0.40%	2	0.50%
Tirosina	(Y)	19	4.20%	19	4.10%	18	4.00%	18	4.00%	20	3.80%	19	4.30%
Valina	(V)	25	5.50%	23	4.90%	27	6.00%	29	6.40%	34	6.50%	29	6.60%
Total		452		467		453		452		527		439	
Peso molecular (Daltones)		46791.6		47640		47233		47239		56152		47153	

### 13.5 Predicción de desorden de cada uno de los aminoácidos que componen la secuencia de la proteína humana FAM222A

Residuos de aminoácidos	IUPRED	PrDOS	PONDR FIT
1	0.2715	0.8121	0.967
2	0.3529	0.7522	0.97
3	0.3807	0.7265	0.944
4	0.4256	0.6443	0.929
5	0.4652	0.6758	0.933
6	0.3948	0.7746	0.916
7	0.384	0.7194	0.918
8	0.2918	0.7414	0.886
9	0.3426	0.7395	0.875
10	0.3599	0.7277	0.829
11	0.384	0.6865	0.836
12	0.4087	0.6338	0.773

13	0.4051	0.5758	0.75
14	0.4476	0.5182	0.699
15	0.4864	0.4585	0.606
16	0.5807	0.4276	0.549
17	0.5707	0.4056	0.476
18	0.4476	0.3977	0.412
19	0.4582	0.3961	0.37
20	0.4186	0.4109	0.369
21	0.3494	0.4157	0.352
22	0.3529	0.4233	0.372
23	0.3286	0.4223	0.386
24	0.3053	0.4211	0.353
25	0.268	0.4233	0.386
26	0.2715	0.433	0.373
27	0.3356	0.4526	0.369
28	0.3599	0.478	0.362
29	0.4766	0.5258	0.338
30	0.3631	0.5598	0.35
31	0.391	0.5835	0.345
32	0.3872	0.6074	0.337
33	0.4149	0.6251	0.396
34	0.4541	0.6311	0.437
35	0.4507	0.6234	0.528
36	0.4507	0.6082	0.554
37	0.4541	0.5904	0.6
38	0.422	0.567	0.602
39	0.4369	0.5469	0.614
40	0.3948	0.5311	0.667
41	0.4369	0.5199	0.579
42	0.4979	0.4884	0.611
43	0.4652	0.4776	0.552
44	0.4409	0.4737	0.506
45	0.4831	0.4617	0.418
46	0.5098	0.4538	0.387
47	0.5176	0.4422	0.328

48	0.4507	0.4296	0.339
49	0.4507	0.4144	0.322
50	0.3529	0.4055	0.267
51	0.4441	0.3905	0.25
52	0.3356	0.3794	0.244
53	0.2436	0.3691	0.25
54	0.2399	0.3525	0.255
55	0.2752	0.3336	0.225
56	0.2752	0.3139	0.191
57	0.2645	0.2896	0.18
58	0.2609	0.2665	0.176
59	0.2328	0.2499	0.155
60	0.3392	0.2418	0.153
61	0.384	0.2387	0.148
62	0.3807	0.2409	0.152
63	0.3774	0.2446	0.152
64	0.4476	0.2514	0.146
65	0.4119	0.2556	0.177
66	0.3983	0.2547	0.223
67	0.4149	0.2603	0.258
68	0.3948	0.2629	0.298
69	0.4087	0.2685	0.311
70	0.4256	0.2741	0.272
71	0.5139	0.2873	0.3
72	0.4149	0.2993	0.311
73	0.5254	0.3173	0.331
74	0.662	0.3358	0.325
75	0.6269	0.3605	0.351
76	0.6227	0.3847	0.358
77	0.6227	0.4077	0.398
78	0.7459	0.4324	0.463
79	0.6136	0.4632	0.418
80	0.6851	0.5115	0.423
81	0.6906	0.5467	0.49
82	0.5493	0.5702	0.558

83	0.562	0.5778	0.513
84	0.5807	0.5719	0.594
85	0.5807	0.5557	0.649
86	0.6806	0.5241	0.666
87	0.6427	0.4757	0.693
88	0.6269	0.4546	0.698
89	0.5098	0.4317	0.693
90	0.5992	0.4224	0.604
91	0.5807	0.4233	0.553
92	0.5055	0.4323	0.537
93	0.5342	0.4492	0.431
94	0.4831	0.4629	0.412
95	0.391	0.4732	0.358
96	0.3356	0.4789	0.321
97	0.3392	0.4705	0.299
98	0.2988	0.4533	0.278
99	0.2575	0.4259	0.286
100	0.2918	0.3906	0.278
101	0.2918	0.3501	0.266
102	0.268	0.3166	0.261
103	0.3529	0.2895	0.261
104	0.3286	0.2764	0.3
105	0.3215	0.2813	0.347
106	0.2817	0.2958	0.362
107	0.2436	0.3251	0.378
108	0.2918	0.3661	0.432
109	0.2645	0.4112	0.463
110	0.3529	0.4556	0.454
111	0.3599	0.5163	0.47
112	0.3286	0.5637	0.502
113	0.3948	0.5957	0.488
114	0.4582	0.6118	0.555
115	0.4256	0.6277	0.606
116	0.4441	0.6353	0.646
117	0.5017	0.6394	0.629

118	0.4979	0.6394	0.592
119	0.4979	0.6277	0.601
120	0.5533	0.6104	0.583
121	0.6322	0.5926	0.569
122	0.6375	0.5728	0.583
123	0.662	0.559	0.557
124	0.6755	0.5543	0.573
125	0.6806	0.5452	0.604
126	0.5854	0.5415	0.551
127	0.6227	0.5476	0.528
128	0.6906	0.5536	0.554
129	0.6269	0.5643	0.568
130	0.6269	0.566	0.561
131	0.5493	0.5569	0.573
132	0.5493	0.5423	0.564
133	0.5139	0.5293	0.578
134	0.5176	0.5197	0.617
135	0.433	0.5172	0.633
136	0.4652	0.5195	0.652
137	0.5577	0.5174	0.632
138	0.4541	0.5123	0.635
139	0.4766	0.5169	0.695
140	0.4441	0.5225	0.69
141	0.4441	0.5222	0.68
142	0.4409	0.5151	0.668
143	0.4476	0.4794	0.695
144	0.3667	0.4597	0.718
145	0.3631	0.4459	0.752
146	0.3807	0.4396	0.737
147	0.3807	0.4437	0.69
148	0.3529	0.452	0.726
149	0.2436	0.4589	0.648
150	0.2918	0.4718	0.633
151	0.3182	0.518	0.618
152	0.3983	0.5456	0.614

153	0.4017	0.5735	0.636
154	0.4801	0.5957	0.645
155	0.4507	0.606	0.604
156	0.5665	0.6107	0.626
157	0.5665	0.6135	0.665
158	0.5707	0.6148	0.71
159	0.7289	0.6257	0.743
160	0.7331	0.6328	0.713
161	0.805	0.6349	0.743
162	0.708	0.6449	0.73
163	0.7369	0.6529	0.761
164	0.6948	0.6518	0.758
165	0.7369	0.6505	0.759
166	0.7036	0.6448	0.702
167	0.6851	0.634	0.723
168	0.7289	0.6236	0.728
169	0.725	0.6111	0.697
170	0.8313	0.6001	0.711
171	0.7415	0.5864	0.747
172	0.6322	0.5716	0.767
173	0.6375	0.5528	0.751
174	0.5254	0.5317	0.749
175	0.5296	0.4879	0.769
176	0.562	0.4667	0.777
177	0.5493	0.4474	0.79
178	0.5901	0.4366	0.803
179	0.4801	0.4303	0.773
180	0.4801	0.4287	0.73
181	0.3872	0.4362	0.75
182	0.4119	0.4521	0.771
183	0.5017	0.4696	0.768
184	0.4766	0.5103	0.805
185	0.5176	0.5321	0.775
186	0.4801	0.5454	0.765
187	0.5342	0.5542	0.752



188	0.5254	0.5496	0.733
189	0.4652	0.5361	0.804
190	0.5098	0.5202	0.786
191	0.5098	0.4773	0.818
192	0.5017	0.4528	0.754
193	0.5211	0.4355	0.74
194	0.3948	0.4135	0.795
195	0.4831	0.3941	0.802
196	0.3948	0.3757	0.789
197	0.4087	0.3613	0.728
198	0.4149	0.3447	0.706
199	0.4369	0.326	0.753
200	0.4087	0.3094	0.678
201	0.4087	0.2994	0.703
202	0.4476	0.293	0.706
203	0.4476	0.2922	0.685
204	0.4256	0.304	0.724
205	0.4017	0.3109	0.676
206	0.3631	0.3188	0.699
207	0.4507	0.3382	0.656
208	0.4507	0.3656	0.654
209	0.4256	0.3998	0.711
210	0.4119	0.4335	0.736
211	0.4186	0.4687	0.723
212	0.4256	0.5258	0.723
213	0.4541	0.5637	0.728
214	0.494	0.6006	0.793
215	0.5139	0.6272	0.803
216	0.5176	0.6411	0.779
217	0.6043	0.6379	0.719
218	0.6183	0.6371	0.8
219	0.5854	0.6382	0.801
220	0.5854	0.6356	0.778
221	0.6806	0.6309	0.746
222	0.6482	0.6328	0.772

223	0.6948	0.6422	0.806
224	0.6661	0.6459	0.791
225	0.6906	0.651	0.779
226	0.6482	0.6538	0.716
227	0.712	0.6373	0.694
228	0.6851	0.6256	0.692
229	0.5296	0.6217	0.746
230	0.5901	0.6221	0.723
231	0.7209	0.6201	0.678
232	0.6531	0.6138	0.659
233	0.6089	0.6163	0.65
234	0.5296	0.6219	0.666
235	0.5577	0.6299	0.599
236	0.6269	0.6324	0.531
237	0.562	0.634	0.487
238	0.5176	0.6271	0.545
239	0.4979	0.6053	0.582
240	0.433	0.5956	0.453
241	0.433	0.5823	0.427
242	0.4864	0.5672	0.442
243	0.3774	0.5441	0.42
244	0.3807	0.5274	0.411
245	0.3774	0.5114	0.374
246	0.3566	0.4702	0.375
247	0.4186	0.4596	0.397
248	0.422	0.4441	0.427
249	0.3599	0.4335	0.446
250	0.4582	0.4242	0.442
251	0.4541	0.4172	0.408
252	0.4582	0.415	0.434
253	0.4652	0.4145	0.45
254	0.5017	0.4165	0.388
255	0.6427	0.4191	0.384
256	0.6089	0.4234	0.433
257	0.5577	0.4277	0.477

258	0.6043	0.43	0.498
259	0.5533	0.4319	0.481
260	0.5176	0.427	0.394
261	0.5901	0.4227	0.42
262	0.5296	0.4206	0.447
263	0.4652	0.4193	0.416
264	0.5901	0.4124	0.394
265	0.6089	0.407	0.39
266	0.5707	0.4065	0.394
267	0.5665	0.4076	0.407
268	0.4507	0.4084	0.363
269	0.4017	0.4152	0.368
270	0.4864	0.409	0.321
271	0.4801	0.3981	0.26
272	0.4619	0.3885	0.257
273	0.3948	0.381	0.238
274	0.4476	0.3828	0.226
275	0.346	0.3848	0.221
276	0.268	0.3823	0.26
277	0.2328	0.3839	0.367
278	0.2164	0.3887	0.508
279	0.2328	0.3935	0.586
280	0.3117	0.3913	0.598
281	0.3356	0.3863	0.581
282	0.3599	0.3691	0.554
283	0.4149	0.345	0.525
284	0.4685	0.3251	0.518
285	0.4979	0.3206	0.586
286	0.5017	0.3238	0.616
287	0.562	0.3345	0.685
288	0.5807	0.3507	0.719
289	0.7369	0.3815	0.685
290	0.6948	0.4128	0.695
291	0.6712	0.4505	0.694
292	0.6375	0.4817	0.663

293	0.5139	0.5351	0.673
294	0.5854	0.5527	0.671
295	0.5533	0.5545	0.725
296	0.6755	0.5605	0.739
297	0.7595	0.581	0.734
298	0.7672	0.5954	0.741
299	0.8279	0.6121	0.702
300	0.7951	0.6363	0.755
301	0.7718	0.668	0.74
302	0.7718	0.6945	0.744
303	0.7718	0.72	0.756
304	0.7672	0.7372	0.703
305	0.6991	0.7432	0.717
306	0.5211	0.7328	0.703
307	0.494	0.7178	0.674
308	0.4725	0.7026	0.666
309	0.4619	0.6891	0.606
310	0.4087	0.6786	0.667
311	0.3807	0.6585	0.639
312	0.3948	0.6542	0.638
313	0.4292	0.654	0.571
314	0.494	0.659	0.589
315	0.494	0.6647	0.606
316	0.494	0.6717	0.598
317	0.494	0.6756	0.588
318	0.5139	0.6742	0.666
319	0.5017	0.6747	0.662
320	0.5419	0.6732	0.681
321	0.4292	0.6691	0.619
322	0.433	0.6634	0.538
323	0.384	0.6423	0.546
324	0.3566	0.6239	0.564
325	0.268	0.6165	0.529
326	0.3215	0.5963	0.458
327	0.4369	0.5729	0.363

328	0.4292	0.5433	0.328
329	0.3286	0.518	0.296
330	0.3286	0.4784	0.261
331	0.2988	0.4655	0.22
332	0.391	0.4504	0.174
333	0.3807	0.4411	0.16
334	0.2849	0.4266	0.153
335	0.2193	0.4123	0.143
336	0.1969	0.3948	0.113
337	0.1702	0.3863	0.113
338	0.1969	0.3702	0.109
339	0.1092	0.3567	0.115
340	0.1643	0.3392	0.101
341	0.1528	0.3262	0.082
342	0.1969	0.3114	0.065
343	0.1424	0.2996	0.057
344	0.1399	0.2719	0.06
345	0.1449	0.2523	0.056
346	0.2258	0.2335	0.058
347	0.2094	0.2231	0.062
348	0.2002	0.2197	0.068
349	0.2224	0.2244	0.078
350	0.2224	0.2377	0.085
351	0.1399	0.251	0.097
352	0.1969	0.2615	0.125
353	0.2193	0.2806	0.146
354	0.1823	0.3076	0.166
355	0.2364	0.3253	0.178
356	0.3019	0.3326	0.195
357	0.2715	0.347	0.215
358	0.2436	0.365	0.219
359	0.1671	0.3839	0.25
360	0.2541	0.3997	0.263
361	0.2645	0.4173	0.25
362	0.2002	0.4341	0.243

363	0.2541	0.4431	0.233
364	0.3392	0.4428	0.219
365	0.3983	0.4533	0.193
366	0.3631	0.4693	0.19
367	0.3087	0.4721	0.197
368	0.3053	0.487	0.196
369	0.3249	0.5226	0.195
370	0.2364	0.542	0.22
371	0.3117	0.5501	0.264
372	0.3983	0.5535	0.282
373	0.4119	0.5557	0.273
374	0.4087	0.5578	0.279
375	0.4087	0.5528	0.331
376	0.4619	0.5449	0.37
377	0.4619	0.5434	0.377
378	0.4507	0.5352	0.38
379	0.5098	0.5263	0.404
380	0.5807	0.528	0.417
381	0.4901	0.5251	0.368
382	0.494	0.5243	0.349
383	0.5758	0.5121	0.341
384	0.5707	0.486	0.356
385	0.5382	0.4826	0.388
386	0.4725	0.4855	0.441
387	0.3948	0.4847	0.474
388	0.433	0.4895	0.458
389	0.4369	0.5147	0.419
390	0.4119	0.513	0.46
391	0.4256	0.517	0.506
392	0.3807	0.4897	0.471
393	0.3774	0.4833	0.436
394	0.3494	0.4737	0.401
395	0.3215	0.4635	0.409
396	0.2817	0.4578	0.394
397	0.2715	0.4494	0.364

398	0.2918	0.4412	0.309
399	0.2884	0.4367	0.313
400	0.3053	0.4377	0.336
401	0.2193	0.4413	0.365
402	0.2164	0.4403	0.391
403	0.1275	0.4352	0.389
404	0.1349	0.4176	0.467
405	0.1501	0.4031	0.581
406	0.0948	0.3857	0.601
407	0.1323	0.3718	0.493
408	0.247	0.3549	0.377
409	0.2645	0.3371	0.321
410	0.1611	0.3247	0.245
411	0.1007	0.3197	0.225
412	0.1373	0.3101	0.172
413	0.2129	0.3025	0.141
414	0.2258	0.2952	0.138
415	0.1969	0.2759	0.155
416	0.1373	0.2533	0.175
417	0.1969	0.2401	0.167
418	0.1852	0.2366	0.151
419	0.1881	0.2381	0.151
420	0.1731	0.2525	0.153
421	0.1731	0.2755	0.152
422	0.2609	0.3079	0.144
423	0.268	0.3423	0.151
424	0.3182	0.3721	0.173
425	0.247	0.3971	0.186
426	0.2541	0.4155	0.14
427	0.346	0.4188	0.109
428	0.2645	0.4179	0.093
429	0.1671	0.4169	0.09
430	0.1611	0.4146	0.087
431	0.2575	0.4162	0.074
432	0.3566	0.4265	0.075

433	0.3566	0.4385	0.082
434	0.3053	0.4431	0.085
435	0.2988	0.4462	0.09
436	0.2436	0.461	0.084
437	0.3182	0.4764	0.094
438	0.247	0.5188	0.106
439	0.2752	0.5448	0.115
440	0.2164	0.5716	0.126
441	0.2193	0.5972	0.18
442	0.2064	0.6203	0.403
443	0.1759	0.6432	0.463
444	0.2094	0.6597	0.44
445	0.2129	0.6681	0.389
446	0.2609	0.6643	0.269
447	0.1969	0.6791	0.289
448	0.1611	0.6851	0.36
449	0.2258	0.7387	0.447
450	0.3087	0.7676	0.508
451	0.2364	0.8387	0.657
452	0.1914	0.9074	0.759