



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EL PAPEL DE YY1 EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN  
CTCF EN CÉLULAS TUMORALES**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**ITZEL MENDOZA ALVARADO**

**Ciudad Universitaria, CD.MX , 2021**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Francisco Javier Plasencia de la Parra

**VOCAL:** Profesor: Euclides Avila Chávez

**SECRETARIO:** Profesor: Gustavo Ulises Martínez Ruiz

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Alberto Ortega Vázquez

**2° SUPLENTE:** Profesor: Javier Axosco Marín

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN PATOLOGÍA EXPERIMENTAL,  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO “FEDERICO GÓMEZ”**

**ASESOR DEL TEMA:**

**FIRMA**

**Dr. Gustavo Ulises Martínez Ruiz**

**SUSTENTANTE:**

**FIRMA**

**Itzel Mendoza Alvarado**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme una formación académica, cultural y científica de calidad.

A mi tutor, el Dr. Gustavo Ulises Martínez Ruiz por su interés y aportaciones en el presente proyecto. Muchas gracias por la confianza.

A mis sinodales, el Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra y el Dr. Euclides Avila Chávez por sus valiosos comentarios y sugerencias para el escrito de esta tesis.

Investigación realizada gracias al Programa UNAM-PAPIIT IA204820.

Investigación realizada con apoyo de CONACYT-Ciencia Básica A1-S-16997.

## índice

<b>1</b>	<b>Resumen .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Marco teórico.....</b>	<b>11</b>
3.1	Características moleculares del cáncer .....	11
3.2	Cáncer de mama.....	12
3.3	Clasificación del cáncer de mama de acuerdo con GEP .....	12
3.3.1	Cáncer de mama positivo a receptor de estrógenos .....	12
3.3.2	Cáncer de mama negativo a receptor de estrógenos .....	13
3.4	Modelos celulares de cáncer de mama .....	15
3.4.1	Línea celular MCF-7.....	15
3.4.2	Línea celular MDA-MB-231 .....	16
3.5	Características de CTCF .....	17
3.5.1	Estructura de CTCF .....	17
3.5.2	Funciones de CTCF .....	17
3.5.3	Alteraciones en la función de CTCF conllevan al desarrollo de enfermedades.....	19
3.6	CTCF en cáncer de mama .....	19
3.7	Características de YY1.....	21
3.7.1	Estructura de YY1 .....	21
3.7.2	Funciones de YY1 .....	22
3.7.3	Regulación transcripcional mediada por YY1 .....	22
3.7.4	Alteraciones de YY1 conllevan al desarrollo de enfermedades .....	24
3.8	El papel de YY1 en el cáncer .....	24
3.9	YY1 en cáncer de mama .....	25
3.9.1	El papel de YY1 sobre la regulación negativa de p27 .....	25
3.9.2	El papel de YY1 sobre la regulación positiva de BRCA1 .....	26
3.10	Interacciones entre CTCF y YY1 .....	27
<b>4</b>	<b>Planteamiento del problema .....</b>	<b>29</b>

<b>5</b>	<b>Hipótesis</b> .....	<b>30</b>
<b>6</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>31</b>
6.1	Objetivo general .....	31
6.2	Objetivos particulares .....	31
<b>7</b>	<b>Material y métodos</b> .....	<b>32</b>
7.1	Cultivo celular .....	32
7.2	Estandarización de oligonucleótidos para ChIP .....	32
7.2.1	Aislamiento de DNA genómico .....	32
7.2.2	Extracción de DNA de cultivo celular .....	33
7.2.3	Búsqueda bioinformática de sitios de unión a YY1 en el gen de CTCF ...	33
7.2.4	Diseño de oligonucleótidos de los sitios de unión de YY1 sobre el gen de CTCF33	
7.2.5	Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida con urea .....	35
7.3	Ensayos de pérdida y ganancia de función de YY1 .....	35
7.3.1	Transfección celular .....	35
7.4	RT-qPCR .....	35
7.4.1	Extracción de RNA total .....	35
7.4.2	Retrotranscripción de RNA a cDNA .....	36
7.5	Western blot .....	36
7.5.1	Extracción de proteínas .....	36
7.5.2	Electroforesis de las proteínas totales .....	37
7.6	ChIP-qPCR .....	37
7.6.1	Preparación de las células .....	37
7.6.2	Fijación de la cromatina .....	38
7.6.3	Inmunoprecipitación de la cromatina .....	38
7.6.4	Purificación del DNA .....	39
7.6.5	qPCR del DNA purificado .....	39
7.7	Análisis estadístico .....	40
7.8	Construcción del plásmido pTREX-YY1 .....	40
<b>8</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>41</b>
8.1	YY1 tiene sitios de unión sobre el gen de CTCF .....	41

8.2	Estandarización de las PCR en tiempo real para la amplificación de los sitios de unión de YY1 sobre el gen CTCF .....	42
8.3	Inmunoprecipitación de la cromatina con anticuerpos anti-YY1 en células MCF-7 y MDA-MB-231 .....	43
8.4	Efecto de la pérdida de función de YY1 sobre la expresión de CTCF en las líneas celulares tumorales MCF-7 y MDA-MB-231 .....	45
8.5	Efecto de la sobreexpresión de YY1 en la expresión de CTCF en las líneas tumorales MCF-7 y MDA-MB-231 .....	47
<b>9</b>	<b>Discusión de resultados .....</b>	<b>49</b>
<b>10</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>53</b>
<b>11</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>54</b>

## Índice de figuras

Figura 1. Características moleculares adquiridas durante el desarrollo tumoral....	11
Figura 2. Clasificación molecular del cáncer de mama de acuerdo con estudios de Perfil de Expresión Génica Global.....	14
Figura 3. Características generales de las células MCF-7 y MDA-MB-231 .....	15
Figura 4. Mecanismos regulatorios de CTCF .....	18
Figura 5. Mecanismos de regulación transcripcional mediada por YY1.....	23
Figura 6. Plásmido pTRex-DEST30-YY1 .....	40
Figura 7. Sitios putativos de unión de YY1 en el gen de CTCF .....	41
Figura 8. Curvas de amplificación y disociación del sitio H .....	42
Figura 9. Estandarización de las condiciones de qPCR.. .....	43
Figura 10. ChIP- qPCR del enriquecimiento de YY1 sobre los sitios de unión dentro del gen CTCF en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 .....	43
Figura 11. YY1 es capaz de unirse a sitios de unión dentro del gen CTCF en MCF-7 no así en MDA-MB-231 .....	44
Figura 12. Efecto de la pérdida de función de YY1 sobre la expresión de CTCF a nivel de proteína y RNAm en células MCF-7 y MDA-MB-231.....	46
Figura 13. Efecto de la ganancia de función de YY1 sobre la expresión de CTCF a nivel de proteína y RNAm en las células MCF-7 y MDA-MB-231 .....	48

## Índice de tablas

Tabla 1. Pares de primers diseñados para la amplificación de sitios de unión de YY1 lejanos y dentro del gen CTCF.....	34
--	----



## 1 Resumen

El cáncer de mama es la primera causa de muerte entre las mujeres que desarrollan algún tipo de cáncer. En México, la mortalidad por cáncer de mama es de 67 mujeres por cada 100,000 habitantes atribuible, en parte, a que más del 50% de los casos son diagnosticados en etapas avanzadas de la enfermedad. Por otro lado, CTCF es una proteína ubicua que posee múltiples funciones entre las cuales destaca la regulación tridimensional del genoma. Alteraciones funcionales de CTCF se han asociado al desarrollo de diferentes tipos de cáncer como es el cáncer de mama. Por otra parte, YY1 es un factor de transcripción que tiene la capacidad de promover o inhibir la transcripción de sus genes blanco. De forma importante, se ha descrito que YY1 desencadena eventos oncogénicos en cáncer de mama. Dado que CTCF y YY1 son proteínas oncogénicas en cáncer de mama, nos preguntamos si existe alguna relación entre la expresión de ambas proteínas. A través de búsquedas y análisis bioinformáticos, determinamos posibles sitios de unión de YY1 en el gen CTCF sugiriendo que YY1 pudiera estar implicado en la regulación de la expresión del gen CTCF. Mediante ensayos de CHIP-qPCR determinamos que YY1 es capaz de interactuar en el gen de CTCF en la línea celular MCF-7 pero no así con la línea celular MDA-MB-231. Dado que las células MCF-7 muestran altos niveles de expresión de CTCF en comparación con las MDA-MB-231, las interacciones de YY1 en el gen de CTCF pudieran jugar un papel en la regulación positiva de la transcripción de CTCF. Para comprobar esto, se inhibió la expresión de YY1 por medio de siRNAs específicos observándose decremento en la expresión de CTCF en las células MCF-7. Aunque no se observó interacción de YY1 en el gen de CTCF en los sitios propuestos en las células MDA-MB-231, se observó que la inhibición de la expresión de YY1 induce decremento de la expresión de CTCF a nivel de proteína sugiriendo que YY1 regule la expresión de CTCF tanto a nivel transcripcional como postranscripcional.

## 2 Introducción

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan principalmente por la replicación celular incontrolada, la evasión de la muerte celular y la adquisición de mecanismos moleculares para invadir otros tejidos <sup>1</sup>. A nivel mundial, en el 2020, el cáncer provocó 9.96 millones de muertes <sup>2</sup>. Específicamente, se diagnostican al año 2.26 millones de casos de cáncer de mama en mujeres. Tan solo en México, la prevalencia de cáncer de mama en mujeres, del 2015 al 2020, fue de 150 casos por cada 100,000 habitantes <sup>2</sup>.

Desde 2006 el cáncer de mama lidera la causa de muertes por cáncer en mujeres mexicanas, representando el 14% de las muertes relacionadas con cáncer. De acuerdo con datos del GLOBOCAN se predice que para el 2030 se diagnosticarán con cáncer de mama a 24,386 mujeres, de las cuales 9,778 (40%) fallecerán <sup>3</sup>. Al igual que otros países de ingresos bajos y medios, en México, el cáncer de mama es detectado en etapas más avanzadas a comparación de países de altos ingresos. El promedio de edad para el diagnóstico en México es de 50 años. Ante este panorama, el sistema de salud mexicano necesita fortalecer el área de diagnóstico temprano <sup>3</sup>.

Durante la búsqueda de biomarcadores en el cáncer de mama, un análisis de 2,074 pacientes mexicanas encontró que el 57% de las pacientes tenían tumores catalogados como receptores de estrógeno positivo, el 20% como tumores HER2 positivos y el 23% fueron triple negativo <sup>3</sup>. La prevalencia del cáncer de mama triple negativo fue más alta que la reportada para pacientes caucásicas (10-13%) y similar al fenotipo de pacientes hispanas (17-30%) <sup>3</sup>.

Aunque el diagnóstico temprano de cáncer de mama aumenta las posibilidades de sobrevivencia, en México más del 50% se detecta en etapas tardías en donde las posibilidades de sobrevivencia son escasas. En este contexto, la quimioterapia no tendrá efecto, por lo tanto, es necesario la búsqueda de los mecanismos moleculares relacionados con los fenotipos agresivos en este tipo de cáncer, para que en el futuro puedan ser considerados como blancos terapéuticos.

Estudios previos han descrito a CTCF como un gen ubicuo que se encarga de regular la estructura tridimensional de la cromatina, y por lo tanto, juega un papel de gran importancia para la correcta expresión génica <sup>4</sup>. Se ha visto que en ciertos tipos de cáncer, la expresión de CTCF se ha correlacionado con peores pronósticos <sup>4</sup>. Por otra parte, YY1 es un factor de transcripción que tiene la capacidad de promover o inhibir la expresión génica, interactuar con proteínas remodeladoras de la cromatina, además de formar asas de DNA que regulan las interacciones de sitios lejanos entre sitios intensificadores (enhancers) y promotores blancos <sup>5</sup>. En distintos tipos de cáncer, YY1 se encuentra sobreexpresado y se ha relacionado a un peor pronóstico <sup>5</sup>. Por lo tanto, es clave determinar si YY1 pudiera participar en la regulación de CTCF, lo cual constituiría un nuevo mecanismo de regulación que podría estar presente en líneas celulares con mayor potencial tumorigénico.

### 3 Marco teórico

#### 3.1 Características moleculares del cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de las células que se puede presentar en cualquier parte del cuerpo y se desarrolla a un tumor primario; en muchos de los casos, las células tumorales invaden otras partes del organismo <sup>1</sup>. En general, existen características moleculares que las células adquieren durante el desarrollo del tumor; estas características incluyen el aumento de la señalización proliferativa, la adquisición de mecanismos para evadir los factores supresores de crecimiento, el desarrollo de la resistencia a la muerte celular, la capacidad de permitir la inmortalidad replicativa, la inducción de angiogénesis y la activación de la metástasis <sup>1</sup> (fig.1).

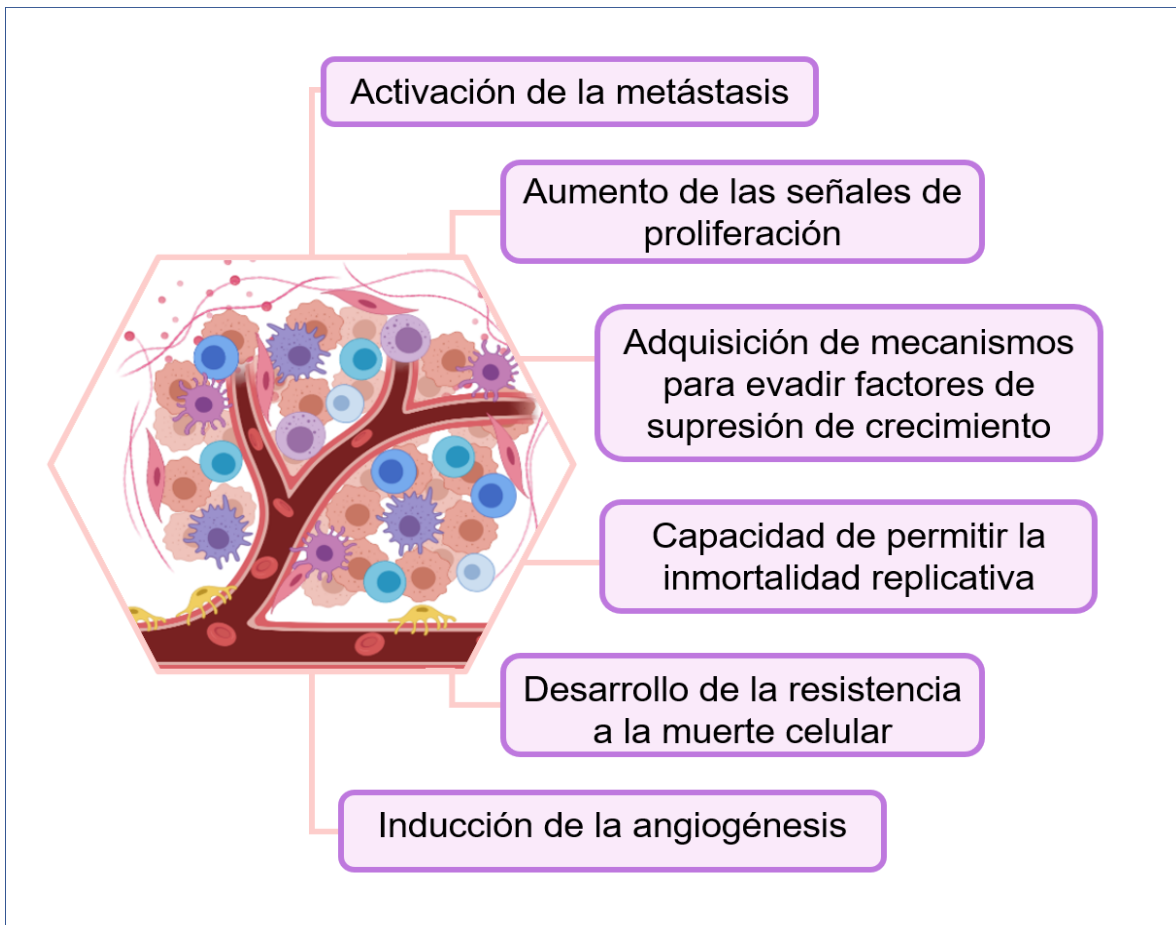


Figura 1. Características moleculares adquiridas durante el desarrollo tumoral.

## 3.2 Cáncer de mama

El cáncer de mama es un complejo grupo heterogéneo de enfermedades que incluye una alta variedad de subtipos con características biológicas distintivas que les permiten responder de diferente forma al mismo tratamiento <sup>6</sup>. Debido a que los tumores con características clínicas y patológicas similares pueden tener comportamientos diferentes, es de gran importancia clasificar el riesgo del paciente de acuerdo con las características moleculares. En este sentido, actualmente, se emplean los GEP (estudios de Perfil de Expresión Génica Global) para realizar una mejor clasificación del cáncer de mama (fig.2).

## 3.3 Clasificación del cáncer de mama de acuerdo con GEP

Los perfiles GEP, en cáncer de mama, se dividen en dos grandes categorías: ER+ (positivos a Receptor de Estrógenos) y ER- (negativos a Receptor de Estrógenos) <sup>6</sup>. Los tumores del grupo ER positivo se caracterizan por la expresión relativamente alta de genes regulados por el ER, citoqueratinas y otros marcadores luminales asociados como los que se encuentran expresados en las células luminales de mama. Debido a esto, se les denomina grupo luminal el cual puede subdividirse en luminal-A, luminal-B y HER2 <sup>6</sup>. El grupo ER negativo se subdivide en: tipo basal, positivo a HER2 (Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano) y tipo normal. Los tumores de tipo basal expresan muchas de las características de las células epiteliales basales de la mama <sup>6</sup>. Otro grupo de tumores se caracterizan por la alta expresión del oncogén HER2, en este grupo la expresión del ER es baja <sup>6</sup>.

### 3.3.1 Cáncer de mama positivo a receptor de estrógenos

El subtipo luminal-A es el más común, representa del 50-60% de todos los tumores de mama. Se caracteriza por niveles altos de ER y niveles bajos de genes relacionados con la proliferación. El subtipo luminal-A engloba a tumores ER+, PR + (Receptor de Progesterona positivo), con HER2 negativo y bajo índice de Ki67. Las pacientes con cáncer de mama luminal-A tienen buen pronóstico y el tratamiento se basa principalmente en la terapia hormonal <sup>6</sup>.

Los tumores luminales-B abarcan del 15-20% de los casos de cáncer de mama y tienen un fenotipo más agresivo con peor pronóstico. En este tipo de cáncer aumenta la expresión de genes relacionados con la proliferación como: v-MYB (mioblastosis oncogén-aviar viral homólogo), GGH (gamma glutamil hidrolasa), LAPTMB4 (proteína transmembrana asociada al lisosoma 4-beta), NSEP1 (elemento sensible a la nucleasa proteína de unión 1) y CCNE1 (ciclina E1) <sup>6</sup>. El índice Ki67 ha sido sugerido como un posible marcador de proliferación que podría diferenciar los tumores luminal-B del Luminal-A en la práctica clínica <sup>6</sup>. Desde el punto de vista inmunohistoquímico, el subtipo luminal-B define a tumores ER-positivo, HER2-negativo y Ki67 alto, y estas características vuelven al tumor de alto riesgo pues son relativamente insensibles a la terapia hormonal y quimioterapia <sup>6</sup>.

HER2 es un proto-oncogén que puede homodimerizarse o heterodimerizarse e interactuar con moléculas de señalización intracelular que activan mecanismos de segundo mensajero “corriente abajo” <sup>6</sup>. Los factores de transcripción que están activados por esta vía regulan muchos genes involucrados en la proliferación y supervivencia celular. El cáncer HER2 positivo representa el 15-20% de los subtipos de cáncer de mama, casi la mitad de los cánceres de mama HER2 positivos son ER positivos (expresado en menores niveles). Estos tumores tienen un mal pronóstico, ya que son resistentes a ciertos agentes citotóxicos y hormonales.

### 3.3.2 Cáncer de mama negativo a receptor de estrógenos

El subtipo de tipo basal representa del 8-37% de los subtipos de cáncer de mama y se caracteriza por la alta expresión de marcadores mioepiteliales basales y ser ER-, PR- y HER2-, por lo que se considera como triple negativo <sup>6</sup>. Los tumores de tipo basal sobreexpresan p-cadherina, fascina, caveolinas 1 y 2, alfa-beta cristalina y EGFR (Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico); en este tipo de cáncer es común la presencia de mutaciones en TP53 (Proteína Tumoral 53) <sup>6</sup>. Es importante señalar que el término triple negativo se refiere a la clasificación inmunohistoquímica de los tumores de mama que carecen de la expresión de proteínas ER, PR y HER2, mientras que el subtipo basal se define mediante el análisis de microarreglos de expresión génica y está disponible solo en el entorno de investigación <sup>6</sup>.

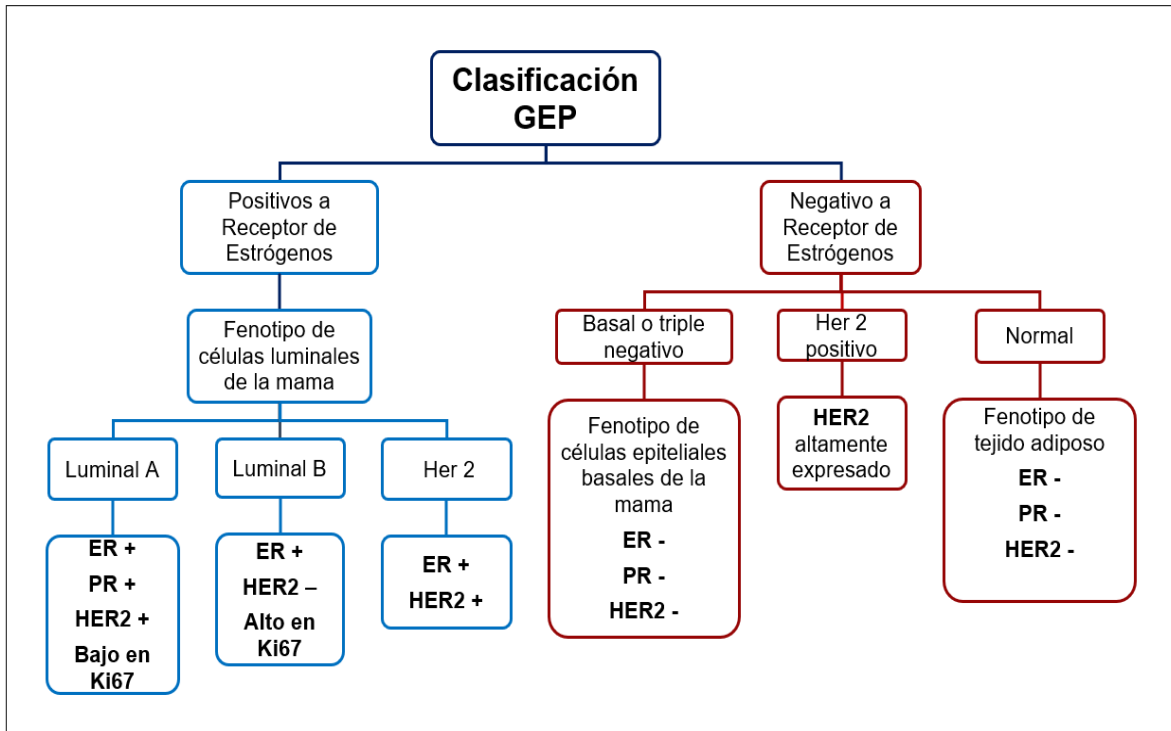


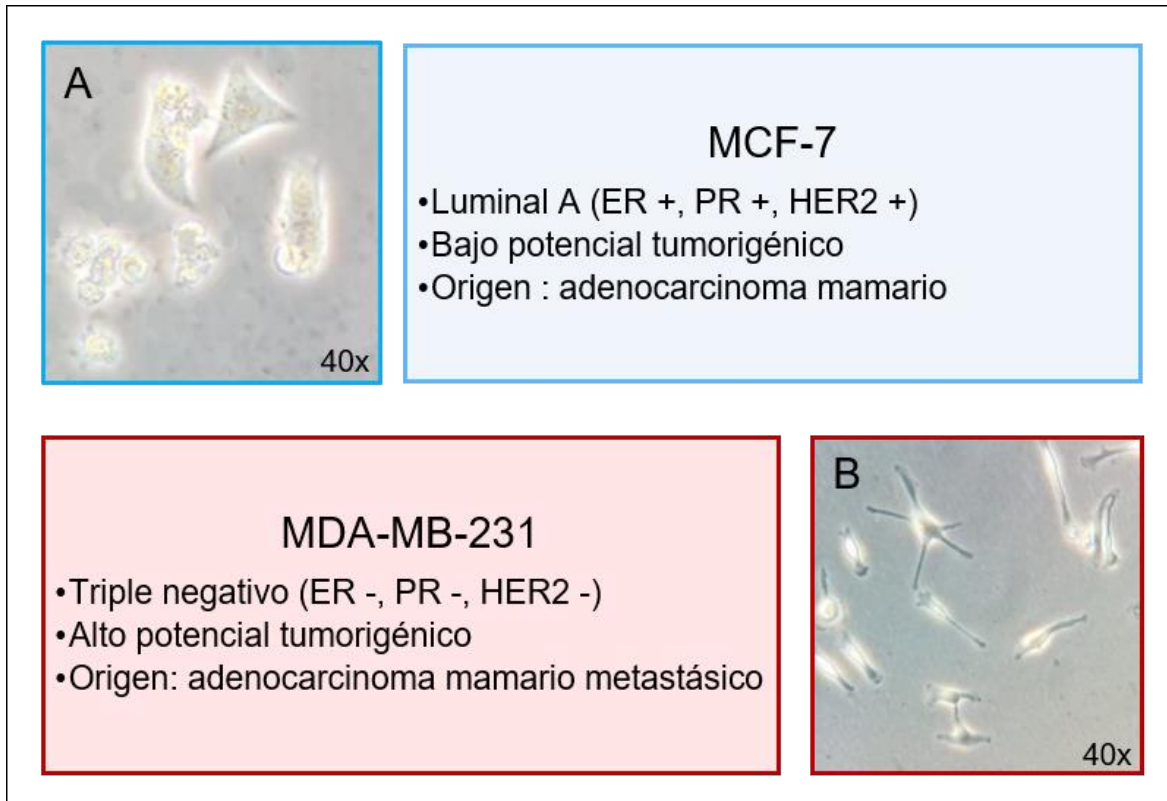
Figura 2. Clasificación molecular del cáncer de mama de acuerdo con estudios de Perfil de Expresión Génica Global. ER: receptor de estrógenos. PR: Receptor de progesteronas. HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.

Los análisis de microarreglos e inmunohistoquímicos demostraron que el subtipo basal constituye aproximadamente tres cuartas partes de los cánceres de mama relacionados con BRCA1 (Gen del Cáncer de Mama 1). Este gen está relacionado tanto con los procesos inherentes de detección de daños en DNA como con los mecanismos de reparación del DNA <sup>6</sup>. Las células deficientes en BRCA1 tienen defectos en los mecanismos de reparación de rotura de doble cadena del DNA <sup>6</sup>.

Existe un subtipo triple negativo que es el “bajo en claudina” y se caracteriza por una reducida expresión de genes implicados en uniones estrechas y adherencias de células-células, incluidas las claudinas 3, 4 y 7, ocludina y cadherina E; además, muestran una alta expresión de genes de transición epitelial a mesenquimatoso y características de célula madre, por lo tanto, el pronóstico para estas pacientes no es alentador.

El subtipo normal de cáncer de mama representa del 5% al 10% de los carcinomas de mama. Se caracteriza por expresar fenotipo del tejido adiposo, generalmente no responde a la quimioterapia y carecen de la expresión de ER, PR y HER2. Hay pocos estudios sobre este subtipo por lo que no se emplea como diagnóstico clínico.

### 3.4 Modelos celulares de cáncer de mama



*Figura 3. Características generales de las células MCF-7 y MDA-MB-231. A) Las células MCF-7 se clasifican, molecularmente, como luminal A debido a que expresan el receptor de estrógenos (ER), el receptor de progesteronas (PR) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2); morfológicamente se caracterizan por ser redondeadas y uniformes. B) Las células MDA-MB-231 son triple negativo debido a que no expresan los receptores hormonales ER, PR y HER1; morfológicamente son células heterogéneas alargadas con extensiones. Las imágenes se observan con un objetivo 40x.*

#### 3.4.1 Línea celular MCF-7

La línea celular tumoral MCF-7 es clasificada como ER+, receptor de progesterona positivo PR+ y pertenece al subtipo molecular luminal A. MCF-7 es una línea celular no invasiva y pobremente agresiva por lo que se considera que



tiene un bajo potencial metastásico <sup>7</sup>. Esta línea celular se obtuvo de un derrame pleural de una paciente de 69 años con adenocarcinoma mamario <sup>7</sup>. El crecimiento de las células de cáncer de mama está controlado no solo por el ER y el PR sino también el receptor del factor de crecimiento asociado a la membrana plasmática. Dos miembros particularmente importantes de esta larga familia son EGFR, que es activado por el EGF (Factor de Crecimiento Epidermal) y HER2, ambos presentes en las células MCF-7. Sin embargo, se considera que MCF-7 expresa moderadamente EGFR <sup>7</sup> (fig. 3 A).

El amplio uso de la línea celular MCF-7 en las investigaciones sobre cáncer de mama refleja su fidelidad en varios aspectos de este carcinoma, particularmente en el tratamiento de mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama con receptores hormonales positivos <sup>8</sup>.

#### 3.4.2 Línea celular MDA-MB-231

La línea celular MDA-MB-231 es de origen tipo epitelial la cual se estableció a partir de un derrame pleural de una mujer caucásica de 51 años con adenocarcinoma mamario metastásico <sup>9</sup>. MDA-MB-231 es una línea celular de cáncer de mama triple negativo (ER-, PR-, HER2-), altamente agresiva, invasiva y poco diferenciada <sup>9</sup> (fig. 3 B).

Como resultado de la falta de expresión de ER, PR y HER2, esta línea celular inicialmente se clasificó como una línea celular de cáncer de mama basal. Sin embargo, ahora se reconoce como perteneciente al subtipo molecular claudina-bajo ya que exhibe una baja regulación de claudina-3, claudina-4 y baja expresión de Ki-67, además, está enriquecida con marcadores asociados a la transición epitelial-mesenquimal y expresa marcas asociadas a células troncales de cáncer de mama (CSCs), con el fenotipo CD44+ CD24-/low <sup>10</sup>.

El cáncer de mama triple negativo es una forma agresiva del cáncer de mama con opciones limitadas de tratamientos <sup>10</sup>. Entender las bases moleculares de este tipo de cáncer es crucial para el desarrollo de nuevos fármacos. Por lo tanto, se han realizado muchos estudios sobre agentes potencialmente activos para este tipo particular de cáncer de mama utilizando la línea celular MDA-MB-231 <sup>10</sup>.

## 3.5 Características de CTCF

### 3.5.1 Estructura de CTCF

El factor de unión al elemento CCCTC (CTCF) es una proteína de 82 kDa, codificada por un gen que está localizado en el cromosoma 16q22.1, y que se expresa de forma ubicua. Sus dominios de unión al DNA se caracterizan por un arreglo en tándem central de 11 dedos de zinc (ZFs) Cys2-His2 (C2H2) <sup>11</sup>. La secuencia de unión a CTCF está presente en 55,555 a 65,000 sitios en el genoma de mamíferos <sup>12,13</sup>. De esos sitios, alrededor de 50,000 están altamente conservados entre mamíferos. Del 30 al 60% de las uniones de CTCF muestran una distribución tejido-específica <sup>12</sup>. Aproximadamente el 50% de los sitios de unión se encuentran en regiones intergénicas, alrededor del 15% están localizados cerca de promotores y el 40% en sitios intragénicos (entre exones e intrones) <sup>14,15</sup>.

### 3.5.2 Funciones de CTCF

Inicialmente, CTCF se caracterizó como un factor de transcripción capaz de activar o reprimir la expresión génica, después, se encontró que muestra propiedades características de insulador, como son la habilidad de interferir en la comunicación de un enhancer-promotor <sup>4</sup> por lo que CTCF y otras proteínas insulador pueden mediar las interacciones intercromosomales e intracromosomales entre sitios distantes del genoma <sup>14</sup> que conllevan al aislamiento cromatínico (Fig. 4 A) .

Originalmente CTCF fue descubierta como un candidato de supresor de tumor, debido a su habilidad de unirse al promotor del oncogén *c-myc* para inhibir su expresión <sup>16</sup>. Las funciones reguladoras mejor descritas de CTCF incluyen la activación o represión transcripcional, el aislamiento cromatínico, la impronta e inactivación del cromosoma X <sup>17</sup>. Junto con la cohesina, CTCF facilita la interacción entre sitios intensificadores y promotores por medio de la formación de asas cromatínicas (Fig. 4 B); CTCF genera las interacciones entre secuencias ubicadas dentro y fuera del asa cromatínica <sup>4</sup>. De esta forma genera patrones de expresión en eucariontes superiores <sup>4</sup>. Actualmente, esta proteína presenta diversos roles en la regulación génica que convergen en la organización estructural tridimensional de

las fibras de cromatina en el núcleo, lo que da como resultado la arquitectura global del genoma <sup>11</sup>.

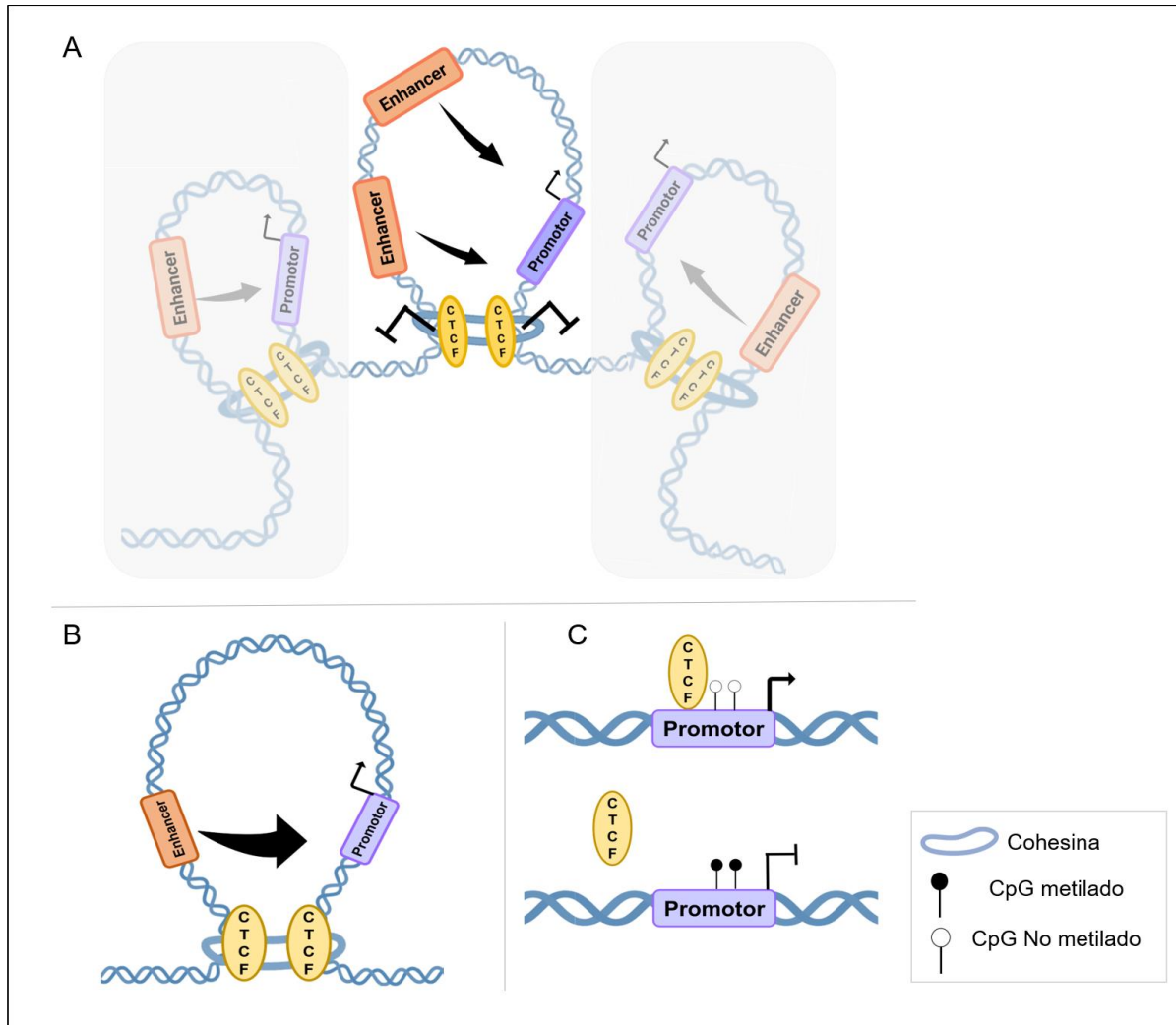


Figura 4. Mecanismos regulatorios de CTCF. A) CTCF juegan un papel como aislador cromatínico al generar dominios delimitados que finalmente conducen a la arquitectura global de la cromatina. B) CTCF tiene la habilidad de formar asa de cromatina que, junto con la cohesina, facilita la interacción entre sitios intensificadores y promotores. C) CTCF actúa como factor de transcripción y es sensible a la metilación de sitios CpGs en sus sitios consenso.

Las interacciones tridimensionales de los complejos proteína-DNA facilitan la transcripción, replicación, reparación del DNA y la mitosis <sup>4</sup>. Por medio de técnicas de microscopía y técnicas relacionadas con la captura conformacional de la cromatina (3C) es posible conocer interacciones específicas del cromosoma <sup>18</sup>.

Experimentos de 3C han revelado que CTCF, en gran medida, es responsable de mediar la organización nuclear y por lo tanto, la expresión génica <sup>4</sup>.

Se ha descrito que el sitio consenso de CTCF en el DNA puede contener dos dinucleótidos CpG (Citosina- fosfato- Guanina) potencialmente susceptibles de ser metiladas y de esta forma inhibir la interacción de CTCF con el DNA <sup>19</sup> (Fig. 4 C). Los sitios de unión a CTCF pueden existir en el genoma en estados de metilación diferentes por lo que la afinidad de la unión de CTCF en el DNA puede variar <sup>19</sup>. Por ejemplo, la presencia de 5mC (5-metilcitosina) en el sitio de unión a CTCF de células específicas está relacionada con una baja afinidad de unión de CTCF al DNA generando cambios en la estructura tridimensional del genoma <sup>20</sup>.

Se ha demostrado que la cohesina es necesaria para mediar el contacto de CTCF con la cromatina y lograr la formación de asas de DNA en la mayoría de los sitios del genoma <sup>21</sup>. También, se ha descrito que CTCF puede formar un complejo con PARP1 (poli (ADP-ribosa) polimerasa 1) y DNMT1 (DNA metiltransferasa 1 ) <sup>14</sup>. Por lo tanto, CTCF participa en la regulación epigenética a través de la modulación de la configuración del genoma.

### 3.5.3 Alteraciones en la función de CTCF conllevan al desarrollo de enfermedades

La disfunción de CTCF está relacionada con enfermedades severas o desórdenes como el retraso mental, síndrome de Beckwith-Wiedemann, síndrome de Silver-Russell y varios tipos de cánceres <sup>22</sup>. Específicamente, CTCF está mutado en diversos tipos de cáncer como leucemia, mama, uterino y cáncer de próstata <sup>23</sup>. Se ha observado que la expresión de CTCF está relacionada con la inhibición del crecimiento de las células cancerígenas y su clonogenicidad <sup>23</sup> ya que regula la expresión de varios genes implicados en la proliferación y la apoptosis, incluyendo los genes supresores de tumor *P53*, *P16* y el gen proapoptótico *BAX* <sup>24,25</sup>.

### 3.6 CTCF en cáncer de mama

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea que se ha asociado con alteraciones en las actividades de los receptores ER, PR y HER2. Varios estudios han reportado que los genes regulados por ER son modulados por CTCF a través

de la unión al ER lo cual promueve la unión a la región genómica blanco y conlleva a un alto ordenamiento de la estructura de la cromatina que favorece la interacción de sitios intensificadores con promotores. De esta forma, se delimita la influencia del ER cuando CTCF está interaccionando con otras proteínas como la cohesina o el activador de la transcripción BRG1 <sup>26,27</sup>.

La interacción de CTCF con sus sitios genómicos blancos es dependiente de la metilación de los dinucleótidos CpG. Se ha reportado que la incapacidad de unión de CTCF a promotores de genes metilados como *TRP53*, *DNMT4A* Y *RUNX1* juega un papel en la tumorigénesis <sup>28</sup>. Por lo tanto, el crecimiento del tumor se ve potenciado por la pérdida de regulación de CTCF para sus genes supresores de tumor blanco <sup>28</sup>. La inhibición de CTCF en cáncer de mama incrementa la migración e invasión; mientras que la sobreexpresión permite inhibir la proliferación celular en células de cáncer de mama <sup>29</sup>. Lo mismo se ha reportado en otros tipos de cánceres humanos por lo que CTCF juega un papel supresor de tumor en cáncer de mama <sup>29</sup>.

En células de cáncer de mama existen disfunciones de CTCF causados por mutaciones; por ejemplo, se ha observado la mutación sin sentido del codón K344E, en el dominio 3 del dedo de zinc de CTCF <sup>22</sup>; esta mutación podría afectar la habilidad de CTCF para unirse a los sitios promotores y sitios que generan dominios delimitados (insulador) de los genes relacionados con la proliferación celular como *MYC*, *PLK*, *PIM-1*, *p19ARF*, e *Igf27H19* <sup>27</sup>. Como resultado de las mutaciones en la región codificante de CTCF, la expresión de sus genes regulados se altera, lo que podría ser una causa del desarrollo de cáncer de mama.

En líneas celulares de cáncer de mama como MCF-7, SKBR3 y MDA-MB-231 hay niveles menores de proteína CTCF con respecto a células mamarias normales y que no corresponde con los niveles de su mRNA <sup>29</sup>; estos datos sugieren que la regulación postranscripcional de CTCF juega un importante papel en cáncer de mama que posiblemente esté potenciando la tumorigénesis <sup>29</sup>. Lo mismo se observó en tejido de cáncer de mama a comparación de tejido no tumoral aledaño a la lesión. Por otra parte, se ha demostrado que una alta expresión de mRNA de CTCF en pacientes con cáncer de mama se correlaciona con un mejor pronóstico

<sup>29</sup>. La inhibición de CTCF promueve la tumorigenicidad y la proliferación celular en las células MCF-7 (no metastásicas). Por el contrario, la sobreexpresión de CTCF en las células metastásicas MDA-MB-321 atenúa la tumorigenicidad y el crecimiento celular <sup>29</sup>.

### **3.7 Características de YY1**

#### **3.7.1 Estructura de YY1**

Ying Yang 1 (YY1) es un factor de transcripción que se caracteriza por contener cuatro dominios de dedos de zinc conservados evolutivamente. Inicialmente, la proteína YY1 fue descrita como un factor de transcripción represor del promotor P5 del adenovirus <sup>30</sup>. También, en presencia o ausencia de la oncoproteína E1A, YY1 actúa como activador o represor (respectivamente) sobre el promotor P5 <sup>30</sup>. Junto con otros estudios se demostró que YY1 puede activar o reprimir la expresión génica, por lo que fue nombrado Ying Yang 1; Yin por la represión y Yang por la activación <sup>30</sup>.

El gen humano YY1 se encuentra codificado por una región genómica de un tamaño de más de 40,000 pares de bases en el cromosoma 14 <sup>31</sup>. Estructuralmente, la secuencia N-terminal de YY1 contiene dominios de activación transcripcional (secuencia de aminoácidos 1-100). La secuencia de aminoácidos 43 a 53 comprende 11 residuos ininterrumpidos ácidos (ácido glutámico y aspártico) mientras que la secuencia de 70 a 80 hay un clúster de 11 histidinas; ambas regiones están conectadas por regiones ricas en glicina (secuencia de aminoácidos 54-69). Debido a su naturaleza ácida, se ha reportado que la región N-terminal de YY1 está relacionada con interacciones electrostáticas, particularmente con proteínas de carga positiva <sup>30</sup>.

La región central de YY1, entre los residuos 201 y 298 juegan un papel importante para la unión a varias proteínas; específicamente en los residuos 201-226 existe un dominio de unión a oncoproteína como E1A, EZH2, MDM2 y AKT <sup>15</sup>.

En la región C-terminal de YY1, la secuencia de aminoácidos 294-414 contiene cuatro motivos de dedos de zinc C2H. En específico, los ZF2 y ZF3 juegan un papel esencial en la transcripción a través de la unión al DNA que es crucial e

indispensable para un buen funcionamiento biológico <sup>30</sup>. YY1 usa esos dominios para activar o reprimir la expresión de los genes al interactuar y reclutar reguladores transcripcionales y proteínas como el factor de transcripción IIB, la RNA polimerasa II, la poli (ADP-ribosil) polimerasa, p300, c-Myc, HDACs, NOTCH, GATA3, etc. <sup>5,31</sup>.

### 3.7.2 Funciones de YY1

YY1 se expresa de forma ubicua en tejidos humanos y controla varios mecanismos celulares, incluyendo la regulación transcripcional (activación/represión), la estructura tridimensional del genoma y el reclutamiento de complejos interactuantes con el DNA (fig.1). Estos eventos están implicados en la regulación de la proliferación celular, la reparación del DNA, el modelado de la cromatina, la apoptosis, la autofagia, la inactivación del cromosoma X, modificaciones epigenéticas y diferenciación celular <sup>5</sup>. También se ha visto implicada en la maduración de los linfocitos B, y con el desarrollo y recombinación de cambio de clase de las inmunoglobulinas <sup>5</sup>. Estas múltiples funciones llevadas a cabo por YY1 es consecuencia, en parte, de las proteínas con las cuales interactúa.

La expresión de los genes específicos para diferentes linajes celulares está controlada, en parte, por elementos reguladores distales de genes como los llamados sitios intensificadores <sup>32</sup>. Los factores de transcripción se unen a los sitios intensificadores y regulan la transcripción de los promotores cercanos o distantes por medio del contacto físico que involucra la formación de un asa de DNA entre el enhancer y el promotor <sup>32</sup> (fig. 5 C).

Además, YY1 puede interactuar directamente con el factor de transcripción, reclutar correpresores e impedir la transcripción del gen blanco. Las regiones de YY1 ricas en glicina y dedos de zinc son fundamentales para la actividad represora o la inducción de la remodelación de la cromatina <sup>33</sup>.

Como resultado de la versatilidad de YY1 para activar o reprimir genes y de reclutar proteínas. YY1 es una proteína con funciones de iniciación, activación y represión transcripcional <sup>33</sup>.

### 3.7.3 Regulación transcripcional mediada por YY1

Típicamente, YY1 regula transcripcionalmente a sus genes blancos por medio de la unión directa al promotor correspondiente o indirectamente a través de

su asociación con las proteínas remodeladoras de la cromatina, modificadoras de histonas (acetilación/desacetilación) <sup>34</sup> (fig.5 D). La acetilación de las histonas mediada por YY1 a través del reclutamiento de p300 permite la activación transcripcional, mientras que la represión mediada por YY1 es llevada a cabo por la desacetilación de las histonas a través del reclutamiento de las HDACs (histonas deacetilasas) <sup>5</sup>.

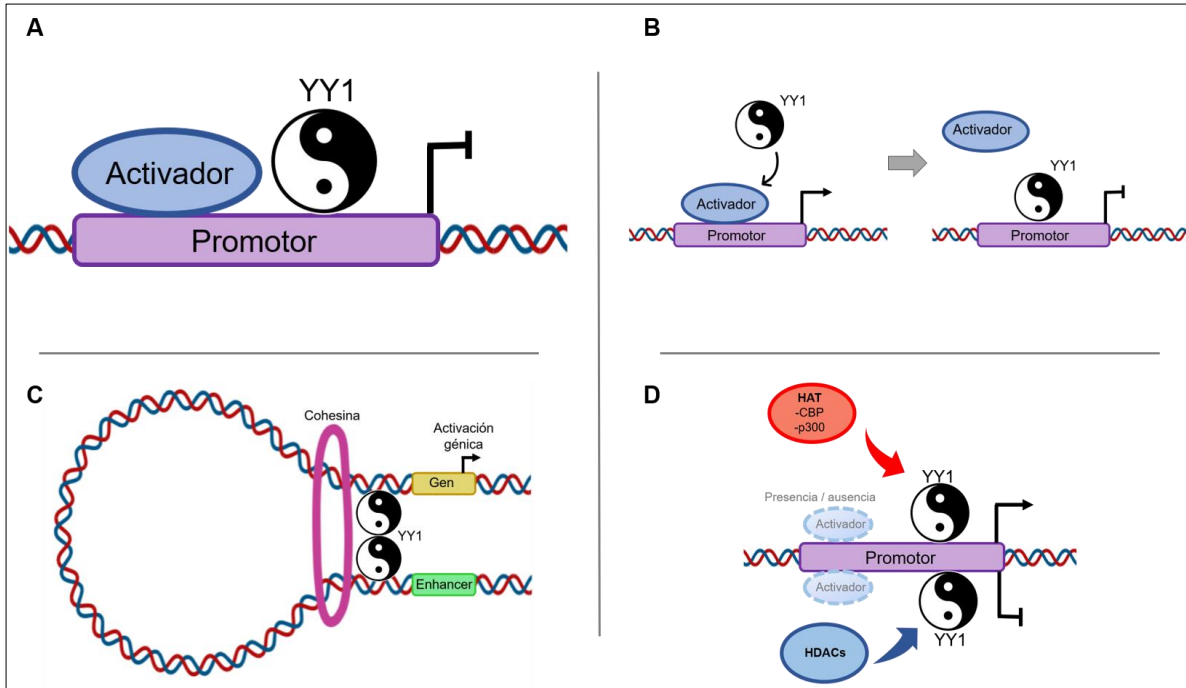


Figura 5. Mecanismos de regulación transcripcional mediada por YY1. (A) YY1 puede unirse al promotor en un sitio distal o proximal a otro activador e impedir la transcripción. (B) YY1 se une de forma competitiva al promotor diana, este mecanismo se puede revertir ante el aumento del factor de transcripción con el que compete. (C) La transcripción se ve favorecida con la formación de asas de cromatina que unen sitios intensificadores distales al promotor blanco, mediada por YY1 y estabilizada por la cohesina. (D) El tipo de regulación que lleve a cabo YY1 depende de las proteínas que reclute; para la activación se reclutan HATs (Ej. CBP, p300) y para la represión HDACs.

El mecanismo por el cual YY1 actúa como represor transcripcional se describe con el modelo de desplazamiento, en el cual cada promotor contiene sitios de unión para factores de transcripción y si ese promotor también tiene sitios de unión para YY1, entonces, ocurre una competencia entre los factores de transcripción con YY1 por la ocupación de sus sitios de unión al DNA. En este caso,



la represión se revierte por el desplazamiento de YY1 por otros factores de transcripción <sup>33</sup> (fig. 5 B).

A pesar de la presencia de un activador en el sitio promotor de un gen, YY1 puede reprimir directamente la transcripción con la unión directa al promotor, tanto en sitios marcados dentro del promotor, como en sitios distales, funcionando como barrera transcripcional <sup>33</sup> (fig. 5 A).

En cuanto a la activación génica, YY1 puede unirse directamente a factores de transcripción para estimular el reclutamiento de la maquinaria transcripcional <sup>33</sup>. Además, YY1 induce la inhibición de factores de represión por lo que se llevará a cabo la activación transcripcional del gen (fig. 5 D). Entre los coactivadores descritos se ha encontrado que YY1 puede interactuar con proteínas histona acetiltransferasas (HAT) como CBP y p300 <sup>33</sup>.

#### 3.7.4 Alteraciones de YY1 conllevan al desarrollo de enfermedades

YY1 juega un importante papel en las enfermedades humanas. La haploinsuficiencia de YY1 ha sido relacionada con el Síndrome Gabriele-De Vries caracterizado por la discapacidad intelectual <sup>32</sup>; mientras que la sobreexpresión de YY1 se ha observado en un amplio espectro de células tumorales por lo que varios estudios han propuesto que YY1 induce la proliferación celular descontrolada, tumorigénesis, potencia la metástasis, la resistencia a la apoptosis mediada por el sistema inmune, y la resistencia a la quimioterapia <sup>32</sup>.

### 3.8 El papel de YY1 en el cáncer

En muchos tipos de cáncer se han observado que YY1 está sobreexpresado, por ejemplo, en cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de cerebro, cáncer cervical, osteosarcoma, cáncer gástrico, leucemia mieloide aguda, etc. <sup>34,35</sup>. Se ha mostrado a YY1 como un regulador clave para la progresión de diferentes tipos de cáncer en donde el mecanismo por el cual contribuye al crecimiento de los tumores es mediante la activación o represión de genes específicos <sup>5</sup>. Sorprendentemente, se ha reportado que YY1 puede tener un papel de supresor de tumor en el cáncer de páncreas. Particularmente, en este cáncer existe una alta expresión de CDKN3 la cual forma

un complejo con MDM2-p53 por lo que no ocurre una expresión de p21, que es gen blanco de p53. Liu D. et al. reportaron que YY1 regula directamente de forma negativa la expresión de CDKN3 al unirse a su sitio promotor. La inhibición de la expresión de CDKN3 conduce a la inhibición de la progresión del cáncer de páncreas <sup>36</sup>.

En el caso del cáncer de mama, se ha reportado que YY1 desempeña un papel de promotor tumoral <sup>5</sup>. Entender las funciones moleculares de YY1 ayudará a comprender mejor su papel regulador en el desarrollo del cáncer, por lo que en el futuro, YY1 podría ser un blanco terapéutico <sup>37</sup>.

### **3.9 YY1 en cáncer de mama**

#### **3.9.1 El papel de YY1 sobre la regulación negativa de p27**

P27 es un inhibidor del ciclo celular durante la progresión de la fase G1 a la fase S. Concordantemente, se ha descrito que p27 está funcionalmente inactivo en la mayoría de los cánceres humanos. Esta inactivación ocurre cuando es fosforilada por el complejo ciclina E-CDK, posteriormente, es reconocida por la ubiquitina E3 ligasa del tipo SCF (Skp1, Cul1, proteína F-box) que media la posterior degradación de p27 por el proteosoma 26S <sup>38</sup>. En los cánceres de mama, próstata, ovario, piel, epitelio oral y pulmonar p27 se encuentra de forma reducida, hasta en un 60% <sup>39</sup>.

De forma importante, se detectó que YY1 está sobreexpresado en muestras de pacientes con cáncer de mama, principalmente en etapas más avanzadas como el carcinoma ductal mamario <sup>38</sup>. Wan et al. estudiaron la relación entre YY1 y p27, debido a que YY1 participa en la modulación de varias proteínas tipo no histonas y que p27 regula parte del ciclo celular <sup>38</sup>. Wan et al. encontraron que la sobreexpresión de YY1 en la línea celular MCF-10A (no tumorigénica) favorece la migración y proliferación celular, mientras que el silenciamiento endógeno de YY1 induce el efecto contrario en la línea altamente tumorigénica MDA-MB-231 <sup>38</sup>. Estos ensayos indican que YY1 promueve la adquisición de fenotipos agresivos. De forma concordante, experimentos *in vivo* de xenoinjertos de la línea celular MDA-MB-231 demostraron que el silenciamiento de YY1 conduce a la disminución de la proliferación celular inhibiendo la formación de tumor en los ratones <sup>38</sup>. Estos

resultados indican que YY1 es determinante para la formación de tumores. Los autores demostraron que la sobreexpresión de YY1 reduce la estabilidad de p27 de forma independiente de la transcripción. Concordantemente, al depletar a YY1 ocurre un aumento de la estabilidad de p27 <sup>38</sup>. Dado que la degradación de p27 es dependiente de la ubiquitinación inducida por Skp2, se cotransfectaron células 293T con p27, Skp2 y cantidades crecientes de YY1. Se observó que YY1 aumentó la cantidad de p27 tanto monoubiquitinado como poliubiquitinado, mientras que la ausencia de YY1 redujo significativamente la poliubiquitinación <sup>38</sup>. Por lo tanto, se demostró que YY1 promueve la ubiquitinación de p27 y su posterior degradación que conlleva al aumento de la tumorigenicidad en líneas celulares de cáncer de mama.

### 3.9.2 El papel de YY1 sobre la regulación positiva de BRCA1

Los genes BRCA1 y BRCA2 contribuyen a la reparación y la regulación transcripcional en respuesta al daño del DNA. Adicionalmente, BRCA1 y BRCA2 regulan transcripcionalmente algunos genes involucrados con el ciclo celular y la apoptosis, por medio de su interacción con otras proteínas <sup>40</sup>.

BRCA1 es el gen de susceptibilidad a cáncer de mama 1 que cumple una función de supresor de tumor. Sus genotipos mutantes predisponen al desarrollo de cáncer de mama y de ovario <sup>41</sup>. BRCA1 tiene una expresión baja en cáncer <sup>40</sup>.

Mediante ensayos de tipo gen reportero se demostró que YY1 induce la expresión de BRCA1 en la línea celular MCF-7. De forma concordante, la sobreexpresión de YY1 condujo al aumento del RNAm y proteína de BRCA1 <sup>40</sup>. Adicionalmente, por medio de inmunoprecipitaciones de cromatina, se demostró que YY1 interactúa físicamente con el promotor de BRCA1 <sup>40</sup>. Por lo tanto, YY1 induce la transcripción de BRCA1 al unirse a su promotor. Mediante ensayos de túnel, se determinó que la sobreexpresión de YY1, en la línea celular MDA-MB-231, no condujo a la apoptosis. Contrario a esto, el silenciamiento de YY1 indujo un aumento de la apoptosis <sup>40</sup>.

Interesantemente, se determinó que YY1 se expresa de acuerdo con la etapa de desarrollo de la glándula mamaria de ratones. Previo a la etapa de reproducción,

YY1 y BRCA1 se encuentran en niveles bajos. En la etapa de embarazo y lactancia las proteínas YY1 y BRCA1 aumentan significativamente <sup>40</sup>. De forma normal, durante la etapa de embarazo y lactancia ocurre un aumento de la proliferación celular, por lo que hay una mayor expresión de YY1 al igual que BRCA1 <sup>40</sup>. En células tumorales, YY1 muestra un papel antiproliferativo mediante la inducción de la expresión de BRCA1 en las células MDA-MB-231 <sup>40</sup>. Además, la sobreexpresión de YY1 inhibe la proliferación y formación del tumor xenoinjerto en ratones inmunocomprometidos así como la formación de focos celulares <sup>40</sup>. Estos experimentos sugieren que YY1 tiene un papel pro-apoptótico, no oncogénico.

### **3.10 Interacciones entre CTCF y YY1**

Las interacciones entre elementos reguladores distales de DNA con los promotores pueden ser facilitadas por los complejos multiproteicos formados por la cohesina y CTCF que son proteínas de unión al DNA y que juntas mantienen la estructura tridimensional del genoma <sup>32</sup>. Estos mediadores unen físicamente elementos distales de DNA a factores de transcripción con la maquinaria de transcripción sobre el promotor <sup>32</sup>.

Las estructuras de la cromatina de tipo asa también se conocen como dominios asociados topológicamente (TADs) que tienden a aislar a los sitios intensificadores y genes por medio de las asas de CTCF-CTCF de elementos fuera del asa <sup>32</sup>.

YY1 y CTCF comparten varias características: ambas son esenciales, se expresan de forma ubicua, tienen proteínas de coordinación con el zinc que pueden unirse a las secuencias hipometiladas del DNA y forman homodímeros <sup>32</sup>.

La organización espacial del genoma dentro del núcleo es dinámica durante las distintas etapas del desarrollo y está vinculada a la regulación espaciotemporal de la expresión génica. La formación de un bucle específico es crítica para la correcta activación e inactivación de genes durante el desarrollo <sup>42</sup>.

Así, la estructuración de un asa entre un elemento regulador distal y un promotor mediada por YY1 es análoga a las estructuras de TADs mediadas por CTCF, que contacta dominios, y aísla vecinos <sup>32</sup>. Este modelo de estructuración de

formación de asas mediado por YY1 participa tanto en la activación de los genes, como en la represión y podrían estar asociados en la desregulación de los genes en cáncer <sup>32</sup>. Por lo tanto, la integridad de las estructuras de dominios TADs son importantes para la regulación adecuada de los genes.

#### **4 Planteamiento del problema**

El cáncer de mama es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas ya que afecta a 67 mujeres por cada 100,000 habitantes. Por ello, es necesario describir nuevos mecanismos oncogénicos para la identificación de blancos moleculares que apoyen el diseño de nuevas alternativas terapéuticas.

Se ha descrito que los genes CTCF y YY1 tienen un papel oncogénico en cáncer de mama. Mediante búsquedas y análisis bioinformáticos, encontramos que existen sitios putativos de unión de YY1 sobre el gen de CTCF. Este hallazgo sugiere que YY1 podría estar regulando la expresión de CTCF por medio de la unión directa a tales sitios en el cáncer de mama. Por lo tanto, el presente trabajo de investigación pretende profundizar sobre el papel de YY1 en la regulación de la expresión de CTCF en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 las cuales se han descrito previamente como células con bajo y alto potencial tumorigénico, respectivamente.

## **5 Hipótesis**

Debido a que dentro del gen CTCF existen sitios de unión putativos para el factor de transcripción YY1, se propone que YY1 mediante su unión directa al promotor del gen CTCF podría estar regulando su expresión a través de mecanismos epigenéticos en líneas celulares tumorales de cáncer de mama.

## **6 Objetivos**

### **6.1 Objetivo general**

Elucidar el papel regulador de YY1 en la expresión de CTCF con el uso de modelos celulares de cáncer de mama.

### **6.2 Objetivos particulares**

- Determinar cambios en la expresión de CTCF por medio de RT-qPCR y western blot posterior a la inhibición de YY1 en las líneas tumorales MCF-7 y MDA-MB-231.
- Determinar cambios en la expresión de CTCF mediante ensayos de RT-qPCR y western blot posterior a la sobreexpresión ectópica de YY1 en las líneas tumorales MCF-7 y MDA-MB-231.
- Determinar la asociación de YY1 en el promotor del gen CTCF mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) acoplados a PCR en tiempo real (qPCR) tras el uso de anticuerpos específicos para YY1.



## 7 Material y métodos

### 7.1 Cultivo celular

Las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 se cultivaron en cajas Petri de 10 cm de diámetro en una atmósfera de CO<sub>2</sub> 5% a 37 °C. Específicamente, para la línea MCF-7 se usó medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) 5%; para las células MDA-MB-231 se usó medio RPMI suplementado con SFB 10% (se usó mismo medio de cultivo en todos los experimentos). Ambas líneas celulares se obtuvieron del ATCC<sup>®</sup>, E.E.U.U.

Las células se incubaron con 1 mL de una solución de tripsina-EDTA 0.05% a 37 °C, durante 2 min y se despegaron las células con golpes suaves en la caja. Las células se transfirieron a un tubo Falcon de 15 mL el cual se centrifugó a 1400 rpm, 8 °C, 2 min. El pellet obtenido se resuspendió en medio de cultivo y se adecuó al volumen necesario para realizar el conteo celular con la cámara de Neubauer.

Para la conservación de las líneas celulares, se congelaron 1 millón de células en crioviales en SFB 50% suplementado con DMSO 8% y medio de cultivo 42%. Las líneas se guardaron a -70 °C hasta su posterior uso. Para descongelar las células, se colocó el criovial en un baño maría a 37 °C y se pasó a un tubo Falcon con 7 mL de su respectivo medio, después se centrifugó a 1400 rpm, 8 °C, 3 min; se resuspendieron en 6 mL de medio de cultivo en caja Petri de 10 cm de diámetro y se incubaron a 37 °C, CO<sub>2</sub> 5 %.

### 7.2 Estandarización de oligonucleótidos para ChIP

#### 7.2.1 Aislamiento de DNA genómico

Se extrajeron 5 mL de sangre periférica de un paciente sano en un tubo con heparina. Posteriormente, la sangre se pasó a un tubo de 50 mL y se diluyó con 5 mL de solución salina: suero fetal (1:1). Cuidadosamente se adicionaron 10 mL de *Lymphoprep*<sup>TM</sup>. El tubo se centrifugó a 1,800 rpm por 20 min a temperatura ambiente (TA). Finalmente se removió el plasma (parte superior del tubo) y con una micropipeta se rescató la interfase que contiene a las células mononucleares

(MNC). Las MNC se lavaron con 2.5 mL de solución salina y se centrifugaron a 1,500 rpm, 10 min.

Para la extracción del DNA, el pellet de células obtenido en el paso anterior se procesó siguiendo las instrucciones del estuche comercial *innuPREP DNA Mini Kit (Analytik Jena, Alemania)*.

### 7.2.2 Extracción de DNA de cultivo celular

Se retiró el medio de cultivo de la caja Petri; posteriormente, se adicionaron 0.75 mL de *DNAzol (Thermo Fisher, E.E.U.U)* y las células se lisaron por pipeteo. Las células lisadas se transfirieron a un tubo nuevo, se centrifugó el tubo a 1500 rpm, 10 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, se adicionaron 0.5 mL de etanol 96% y se mezcló por inversión varias veces. El tubo se incubó 3 min a TA , el precipitado blanco que se formó se transfirió a un tubo nuevo y se lavó con 0.8 mL de etanol al 75% con inversiones del tubo seis veces. Se dejaron pasar 60 s para que el DNA se precipite, después, se removió el etanol y se dejó secar el DNA 15 s para remover los residuos de etanol. El DNA se disolvió con NaOH [8 mM], para asegurar la disolución completa se adicionó HEPES [1 M] para un pH de 7.0.

### 7.2.3 Búsqueda bioinformática de sitios de unión a YY1 en el gen de CTCF

En la plataforma de *UCSC Genome Browser* <sup>43</sup> se identificaron sitios de unión de YY1 sobre el gen de CTCF y sitios lejanos de unión de YY1 sobre el mismo cromosoma. Los sitios de unión de YY1 se confirmaron con la base de datos *Eukaryotic Promoter Database* <sup>44</sup>, *PROMO* <sup>45</sup> y *JASPAR* <sup>46</sup>. Las matrices de los sitios más similares se comprobaron en la plataforma de *JASPAR*. De los 13 sitios encontrados, se seleccionaron 11 y se logró la estandarización de 9 de ellos.

### 7.2.4 Diseño de oligonucleótidos de los sitios de unión de YY1 sobre el gen de CTCF

Se seleccionaron sitios de unión a YY1 lejanos y dentro del gen CTCF. Posteriormente, se diseñaron pares de oligonucleótidos (tabla 1) con el uso de

herramientas bioinformáticas del National Center for Biotechnology Information (NCBI, E.E.U.U.).

*Tabla 1. Pares de oligonucleótidos diseñados para la amplificación de sitios de unión de YY1 lejanos y dentro del gen CTCF. Se muestra la temperatura de fusión Tm en °C que se empleó experimentalmente y el tamaño del amplicón en pares de bases (pb). Se incluye el par de oligonucleótidos LINC0067 usado como control positivo de unión del ChIP de CTCF. CTCF y YY1 son oligonucleótidos que se emplearon para la determinación de la expresión de su respectivo RNAm; HPRT se usó como gen constitutivo.*

Sitio de unión de YY1 en el promotor de CTCF	Secuencia 5'-3' (sent/ant)	Tm (°C)	Tamaño (pb)	Tm Experimental (°C)
A	ttcatcccatgagctgggagagg	63.69	83	64
	gcgtccttctcttctctctgact	64.07		
B	tggactagcggggacaatg	59.10	141	60
	gcaacatggccattacttattgg	58.63		
C	gatgccagggttgggtcttctgc	64.09	167	64
	acttgcgtcttgggtcacaggt	64.18		
D	gcctctaggtgtcacgatgg	59.90	97	60
	gggacggtagaggagacaa	60.32		
E	gcttaagggttcggaccgact	62.10	129	64
	cagggtaggttcggggac	61.36		
F	tttctcttcccagctctgccctc	64.10	198	64
	tcctccgtgagctgtccctg	63.41		
G	ctcttgtccctggctcaggtctc	64.13	146	64
	tgtgctgttggcagatggtgag	63.72		
H	ctcaccatctgccaacagcaca	63.72	120	64
	tcacgctccagcctcaatgtctc	64.64		
I	gtccctggactgttctctctccc	64.10	133	64
	agttgacgtactggtacagcgg	64.83		
LINC0067	tcttgcttctcagggttgc	60.61	86	61
	acaggctctctatgccttgttgc	61.12		
Det-CTCF	tgcggaaagtgaaccatgata	60.03	103	60
	cccttgttctagtgtctccacc	60.03		
Det-YY1	tggagagaactcacctcctgat	60.03	112	60
	agggcaagctattgttcttga	60.03		
Det-HPRT	ttgtgacctgctggattacat	60.03	111	60
	gcctgttgactggtcattaca	60.03		

### 7.2.5 Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida con urea

El tamaño de los amplicones obtenidos en la qPCR, se corroboró mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 11.5% en presencia de urea [8 M]. Se cargaron 3  $\mu$ L de producto de qPCR y se corrió el gel a 150 V por una hora. El gel se reveló en un foto-documentador con bromuro de etidio.

## 7.3 Ensayos de pérdida y ganancia de función de YY1

### 7.3.1 Transfección celular

Para la inhibición de YY1 se sembraron 175,000 células en cajas Petri de 35 mm, las cuales se transfectaron con siRNAs específicos para YY1. Brevemente, se adicionaron 800  $\mu$ L de medio de cultivo sin SFB, 6  $\mu$ L de Lipofectamina *RNAiMax* (Invitrogen, E.E.U.U.) y 100 ng de cada uno de los tres pares de siRNA específicos contra YY1 (IDT, E.E.U.U.). De forma similar, se transfectaron siRNAs control negativo los cuales no se aparean de forma específica con algún mRNA. Para el ensayo de ganancia de función se adicionaron 2  $\mu$ g del plásmido pTrex vacío (*New England Biolabs, E.E.U.U.*) como control o pTrex-YY1, previamente preparado por el grupo de trabajo, el cual contiene la secuencia codificante de YY1 humano<sup>47</sup>. La transfección se incubó por 5 horas, pasado este tiempo se adicionó el medio de cultivo respectivo suplementado con SFB. Después de 24 h a los pozos se les cambió de medio y se dejaron incubando 24 h. De estas células se extrajeron proteínas totales y RNA total.

## 7.4 RT-qPCR

### 7.4.1 Extracción de RNA total

A cada pozo con células se les retiró el medio y se les adicionó 1 mL de TRIzol; se siguieron las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Brevemente, se adicionó a cada tubo 500  $\mu$ L de cloroformo, se agitó en vórtex y se incubó en hielo por 10 min. Los tubos se centrifugaron a 4 °C, 10,000 rpm por 10 min. La fase orgánica se recuperó y se pasó a un tubo nuevo al cual se le adicionaron 500  $\mu$ L de isopropanol, se agitó en vórtex y se incubó 10 min, posteriormente, se centrifugó a 10,000 rpm, el pellet obtenido se lavó con etanol al 75%; los tubos se volvieron a

centrifugar y el pellet obtenido se dejó secando a temperatura ambiente. Cada muestra se disolvió en agua libre de RNasas y se cuantificó en el nanodrop a 260 nm.

#### 7.4.2 Retrotranscripción de RNA a cDNA

Las muestras de RNA extraídas se emplearon para la transcripción reversa a cDNA con el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermo Fisher, E.E.U.U.); para cada reacción se pipetearon 2.0 µL de amortiguador de transcripción reversa 10X, 0.8 mL de mezcla de desoxirribonucleótidos 25X, 2.0 µL de cebadores (oligo-dT) al azar, 1 µL de transcriptasa reversa MultiScribe, 1.5 µg de RNA muestra y el resto de H<sub>2</sub>O hasta completar un volumen de 20 µL. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 25 °C , 10 min; 37 °C, 120 min; 85 °C 5 min y 4 °C ∞.

### 7.5 Western blot

#### 7.5.1 Extracción de proteínas

Se cultivaron las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7 en cajas Petri de 35 mm hasta una confluencia del 90 %. Cada caja se lavó dos veces con 800 µL de PBS (solución amortiguada de fosfatos). Posteriormente, se adicionaron 800 µL de PBS y se despegaron las células con un gendarme, estas células se pasaron a un tubo nuevo y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 30 s. El sobrenadante se descartó y al pellet se le adicionaron 75 µL de amortiguador RIPA [Tris 50 mM pH 7.5; NaCl 150 mM, NP-40 1%; desoxicolato de sodio 0.5%] suplementado con inhibidores de proteasas (Promega); estos tubos se incubaron por 20 min en hielo y después se centrifugaron a 13,000 rpm a 4° C por 10 min. El sobrenadante obtenido que contiene a las proteínas solubles totales se transfirió a un tubo nuevo. La cuantificación de las proteínas se realizó con *QuantiPro BCA Assay kit* (Sigma-Aldrich, E.E.U.U.). Brevemente, se realizó una curva estándar usando soluciones estándar de BSA (Albúmina de Suero Bovino) en una placa de 96 pozos determinándose la absorbancia en un lector de placas (Bio-Rad). Las absorbancias de las muestras problemas se interpolaron con la ecuación de la recta para conocer su concentración real.

## 7.5.2 Electroforesis de las proteínas totales

Se prepararon geles de poliacrilamida SDS-PAGE (12% para YY1 y GAPDH; 7% para CTCF y PARP), los cuales se precorrieron por 10 min a 90 volts. 50 µg de cada muestra de proteína se desnaturalizaron con una incubación de 95°C, 8 min con amortiguador de carga para proteínas [Tris-HCl 250 mM pH 6.8; SDS 10%, glicerol 30%; DTT 500 mM; azul de bromofenol 0.05%; β-mercaptoetanol 2%]. Cada gel se corrió por una hora a 120 volts.

La transferencia de las proteínas totales del gel SDS-PAGE a una membrana de PVDF (previamente hidratada con etanol y agua) se realizó con un transblot (Bio-RAD) a 20V, por 20 min usando amortiguador de transferencia [Tris base 25 mM, glicina 0.2 M, MeOH 20%, SDS 1.3 mM]. Posteriormente, la membrana se dejó secar, se hidrató con etanol y se incubó en agitación con la solución de bloqueo [albúmina 3% en TBS-Tween 0.01%] por 1.5 h. Esta membrana se colocó en una bolsa sellada a la cual se le adicionó una dilución de anticuerpo primario [1:1000] en solución de bloqueo y se dejó incubando a 4 °C por una noche. Se emplearon anticuerpos específicos para YY1, CTCF, GAPDH y PARP (*Cell Signaling Technology, E.E.U.U.*)

Después de la incubación, la membrana se lavó por 1 hora con solución de lavado [TBS-Tween 0.01%] en agitación (se cambió cada 10 min). Posteriormente, la membrana se incubó en una solución con el anticuerpo secundario Cy5 (*Sigma-Aldrich*) [1:1000] en albúmina al 3% a TA por 1 h en agitación. Finalmente, la membrana se reveló en el equipo *LI-COR Odyssey CLx*.

## 7.6 ChIP-qPCR

### 7.6.1 Preparación de las células

Las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 se tripsinizaron y se centrifugaron a 1,400 rpm, 8 °C por 2 min. Posteriormente, las células MCF-7 se resuspendieron en medio DMEM sin SFB y las células MDA-MB-231 en medio RPMI sin SFB. Se realizó el conteo celular con la cámara de Neubauer. De cada línea se tomaron 4 millones de células y se aforó a un volumen de 5 mL de su respectivo medio sin SFB en un tubo Falcon de 50 mL.

### 7.6.2 Fijación de la cromatina

Al tubo con las células se le adicionaron 5  $\mu$ L de formaldehído 1% y se dejó incubar a TA por 3 min con agitación esporádica. Para detener la reacción, se le adicionaron 250  $\mu$ L de glicina 2.5 M disuelta en TBS fría, posteriormente, se incubó durante 5 min a TA. El tubo se centrifugó a 4,500 rpm, 6 °C por 3 min; se retiró el sobrenadante y el pellet se lavó dos veces con 20 mL de solución salina fría, con centrifugación a 4,500 rpm, 6 °C por 3 min.

Al pellet obtenido se le adicionaron 500  $\mu$ L de amortiguador de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM, SDS 1% m/v, inhibidor de proteasas 1X) y se resuspendió con pipeta. Después, se incubó en hielo por 10 min y se sonicó con las siguientes condiciones: 2.5 min con potencia de 35% por 30 s, 30 s de pausa por 10 ciclos (Sonicador Vibra-cell VCX-130PB, E.E.U.U).

Para conocer el tamaño del fragmento obtenido se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% en donde se cargaron 5  $\mu$ L del producto sonicado con 3  $\mu$ L del amortiguador de carga; las muestras se corrieron por 25 min a 100V en una cámara de electroforesis.

Cada producto de sonicado se centrifugó a 10,000 rpm, 5 min. a 8 °C para eliminar el debris celular. 100  $\mu$ L de producto de sonicado centrifugado se diluyeron con 900  $\mu$ L de amortiguador de dilución [Tris-HCl 16.7 mM, pH 8.0, EDTA 1.2 mM, NaCl 167mM, TritonX-100 1%, SDS 0.01 %]. A cada tubo se le adicionaron 15  $\mu$ L de perlas magnéticas-proteína A (Thermo scientific, Pierce) y se dejó incubando a 4 °C por 1.5 h en agitación. Los tubos se colocaron en el magneto (Invitrogen, DynaMag-2 magnet) y el medio se recuperó en un tubo nuevo. A cada tubo se le adicionaron 2.5  $\mu$ g del anticuerpo YY1 y 0.75  $\mu$ g de anticuerpo IgG, estos se dejaron incubando a 4 °C por una noche en agitación.

### 7.6.3 Inmunoprecipitación de la cromatina

A cada tubo se le adicionaron 30  $\mu$ L de perlas magnéticas y se dejaron incubando a 4 °C por 1.5 h en agitación. Posteriormente, los tubos se colocaron en el magneto y se desechó el sobrenadante. A cada tubo se le adicionó 1 mL de amortiguador de dilución [Tris-HCl 16.7 mM pH 8.0, EDTA 1.2 mM, NaCl 17.7 mM,

SDS 1%, Triton 0.1%], se incubó por 5 min a 37 °C con agitación esporádica en vórtex y se retiró el medio con el tubo colocado en el magneto.

Para cada tubo se realizaron los siguientes lavados: primero se lavaron las perlas magnéticas con 1 mL de amortiguador con baja sal [Tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, SDS 0.1%]. Posteriormente se lavó con 1 mL de amortiguador con alta sal [Tris-HC 20 mM pH 8.0, EDTA 2 mM, NaCl 500 mM, Triton X-100 1%, SDS 0.1%]. Luego se lavaron con 1 mL de amortiguador LiCl/detergente [Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, deoxicolato de sodio 1%, Igepal CA-630 0.5%, LiCl 0.25 M]; después con 1 mL de amortiguador TE [Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM]. A cada tubo se le adicionaron 250 µL de amortiguador de elución [NaHCO<sub>3</sub> 0.1M, SDS 1%], se incubaron a 40 °C por 15 min y agitación esporádica con el vórtex, se repitió este último paso. El sobrenadante obtenido se recuperó en un tubo nuevo. A los 500 µL de sobrenadante obtenido en total, se le adicionaron 20 µL de NaCl 5 M y se calentaron a 65 °C por una noche.

#### 7.6.4 Purificación del DNA

Para cada tubo se adicionaron 10 µL de EDTA 0.5 M más 5 µL de proteinasa K y se incubaron a 45 °C por 1.5 h. Finalmente, las muestras de DNA se purificaron con el estuche comercial *QIAquick PCR purification* (QIAGEN, Alemania). Brevemente, cada muestra se transfirió a tubos Falcon de 15 mL al cual se le adicionaron 50 µL de acetato de sodio o hasta obtener un color amarillo. Cada muestra se pasó a la columna con tubo receptor y se centrifugó a 1,300 rpm, 1 min. después, la columna se lavó con 750 µL de amortiguador PE, se centrifugó dos veces a 1,300 rpm. A cada columna se le adicionaron 50 µL de amortiguador EB, se incubaron por 3 min y se centrifugó con un tubo receptor nuevo a 1,300 rpm. El DNA purificado se cuantificó en el NanoDrop (Thermo Scientific).

#### 7.6.5 qPCR del DNA purificado

Para cada muestra se adicionaron a tubos de PCR 6.25 µL *SYBR Green* (Thermo Scientific), 0.38 µL de oligonucleótido sentido 1 µM, 0.38 µL de oligonucleótido antisentido (*T4oligo*, México) 1 µM, 3 µL de DNA purificado y 2.5 µL





Los ensayos de sobreexpresión se realizaron con el plásmido comercial pT-Rex-DEST30 (*Thermo Fisher, E.E.U.U*) vacío como control. La secuencia codificante de YY1 se clonó en el vector pTREX-YY1, previamente preparada por el grupo de trabajo (fig. 6) <sup>47</sup>.

## 8 Resultados

### 8.1 YY1 tiene sitios de unión sobre el gen de CTCF

Mediante búsquedas bioinformáticas con el uso de los programas JASPAR, PROMO, ENCODE y EPD se encontraron sitios de unión del factor de transcripción YY1 sobre el promotor de CTCF (fig. 7). Esta evidencia nos hizo preguntarnos si YY1 podría estar regulando la transcripción de CTCF. Debido a que YY1 participa en la formación de asas de cromatina de corto y largo alcance para promover la transcripción mediante el acercamiento de factores de transcripción al promotor del gen blanco <sup>34</sup>. En primera instancia, se decidió analizar si YY1 pudiera interactuar a lo largo del gen CTCF. Por lo tanto, se diseñaron iniciadores específicos para amplificar, por qPCR, tales sitios y analizar el enriquecimiento de estos sitios genómicos posterior a realizar el ChIP con anticuerpos específicos para YY1. Se diseñaron nueve sitios de unión de YY1 cercanos y lejanos al gen CTCF (fig.7 y tabla 1).

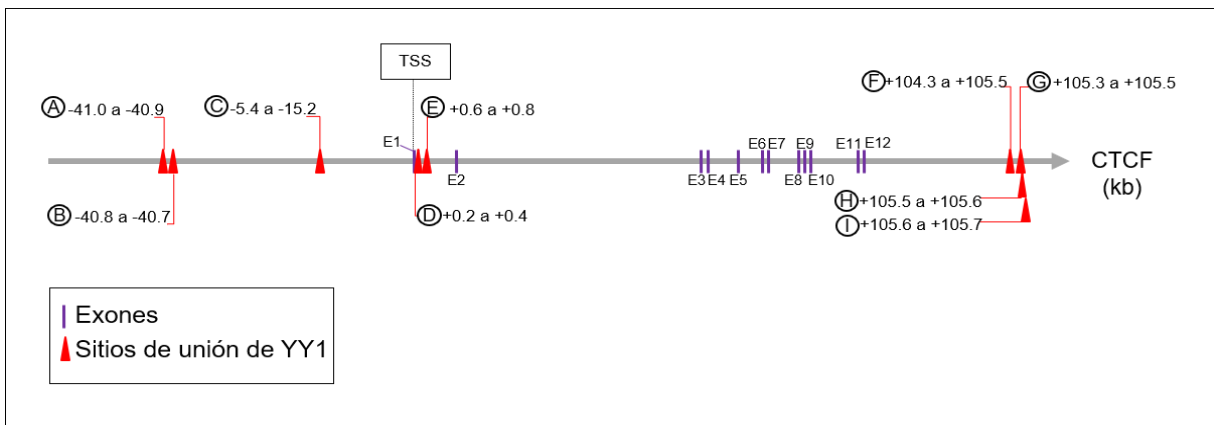
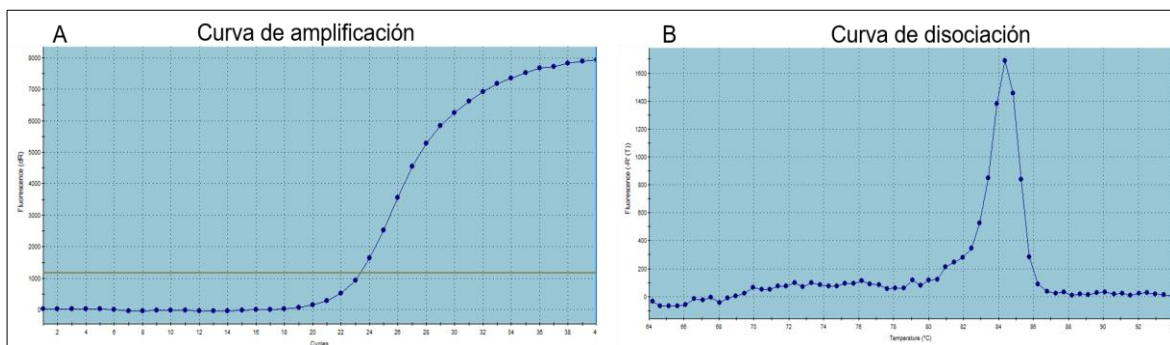


Figura 7. Sitios putativos de unión de YY1 en el gen de CTCF. Se marcan los sitios de unión de YY1 estudiados (triángulos rojos) y los exones de CTCF (barras moradas). Las posiciones con respecto al TSS (sitio de inicio de la transcripción) se muestra en kb: kilo bases.

## 8.2 Estandarización de las PCR en tiempo real para la amplificación de los sitios de unión de YY1 sobre el gen CTCF

A partir de DNA genómico de las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 se estandarizaron las condiciones de qPCR. Para cada par de oligonucleótidos (tabla 1) se emplearon 200 ng de DNA, la temperatura de desnaturalización y elongación fue la misma para todos los pares, mientras que la temperatura de alineamiento fue específica (tabla 1). Se pudo comprobar la especificidad de cada par de oligonucleótidos con la curva de disociación obtenida (fig. 8).



*Figura 8. Curvas de (A) amplificación y (B) disociación del sitio H. Este par de oligonucleótidos amplificó a una  $T_m$  de 64°C desde el ciclo 24 para productos específicos (un solo pico bien definido en B).*

Aunque las curvas de amplificación y disociación de la qPCR dieron información sobre la especificidad, no nos brindan evidencia sobre el tamaño de los amplicones. Por tal motivo, se decidió corroborar la identidad y especificidad de los productos amplificados por PCR mediante la comparación de peso del producto amplificado experimentalmente contra el teórico en un gel de urea, con el cual es posible observar una buena resolución. En la figura 9 se aprecian las bandas esperadas en la qPCR; el tamaño del amplicón del sitio B es de 141 pb, el del sitio C de 167 pb, del sitio A de 83 pb, del sitio G de 146 pb, del sitio H de 120 pb y del sitio I de 133 pb. Por lo tanto, se validó la especificidad de los oligonucleótidos.

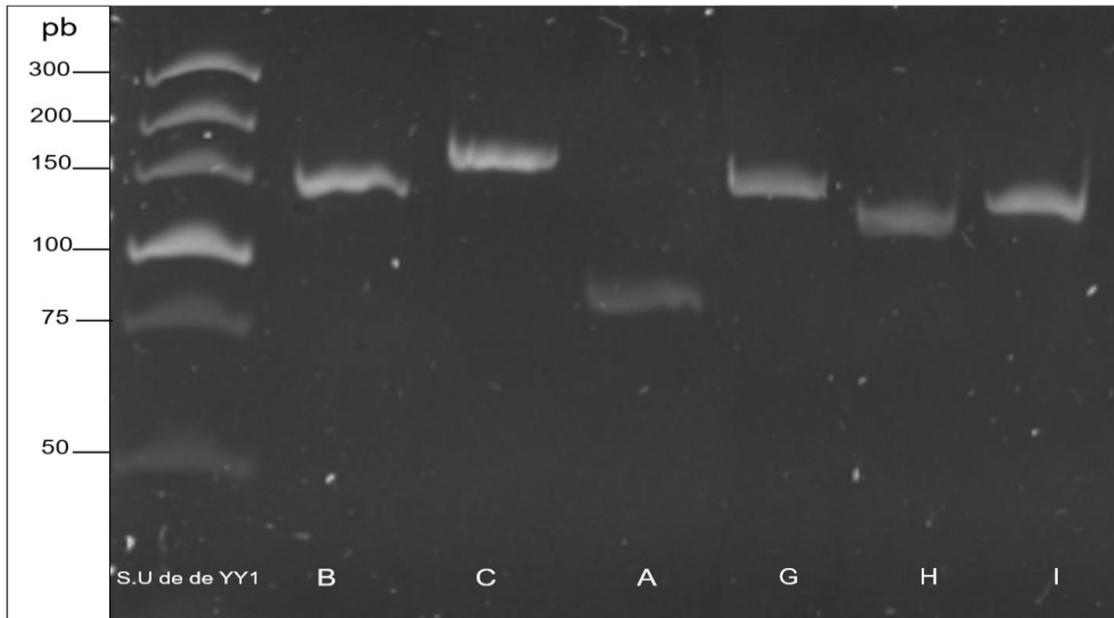


Figura 9. Estandarización de las condiciones de qPCR. Productos de qPCR obtenidos durante la estandarización de los oligonucleótidos y separados en un gel de poliacrilamida-urea para verificar el tamaño de los amplicones (pb) y la especificidad de los oligonucleótidos. S.U: sitio de unión.

### 8.3 Inmunoprecipitación de la cromatina con anticuerpos anti-YY1 en células MCF-7 y MDA-MB-231

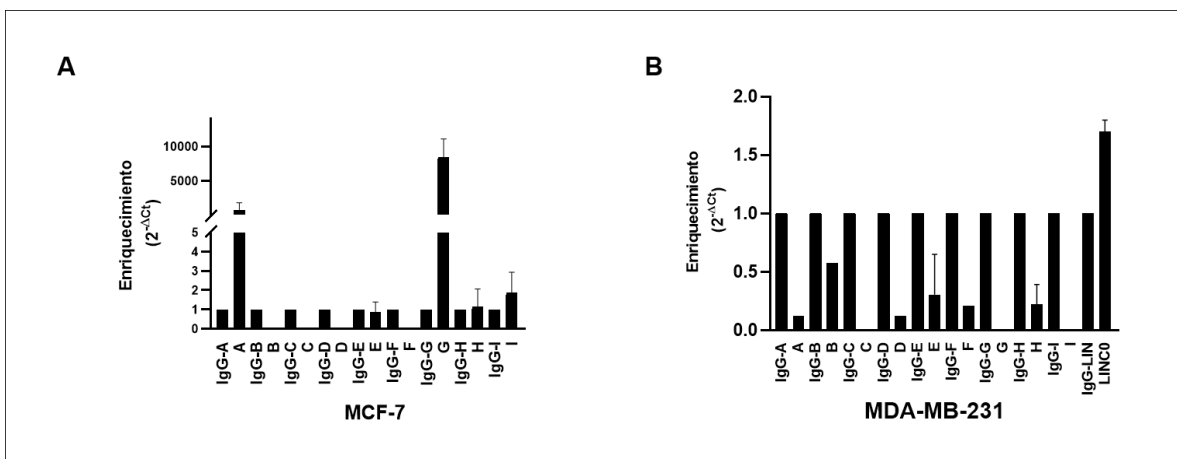


Figura 10. ChIP- qPCR del enriquecimiento de YY1 sobre los sitios de unión dentro del gen CTCF en las líneas celulares (A) MCF-7 y (B) MDA-MB-231. Las barras muestran el promedio de tres experimentos independientes  $\pm$  desviación estándar. Como controles se emplearon anticuerpos inespecíficos IgG. Se incluyó un control positivo, LINC0, en la línea celular MDA-MB-231 para la validación del ChIP-qPCR.

Se realizó la inmunoprecipitación de la cromatina con un anticuerpo específico contra YY1 y la cuantificación relativa con respecto a la condición control del enriquecimiento de la unión física entre YY1 y cada uno de los sitios de interés en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231 (fig.10 A y B respectivamente). Se observó que en las células MCF-7 hay un enriquecimiento de YY1 en los sitios de unión A, G e I (fig. 11 A). En cambio, en las células MDA-MB-231 no se observaron uniones significativas en ningún sitio de estudio. Es de importancia destacar que para las células MDA-MB-231 se incluyó el control positivo de interacción entre YY1 y el DNA el cual es circundante al gen LINC00673 (fig. 10 B) el cual es un RNA largo intergénico no codificante <sup>48</sup> para la validación del ChIP-qPCR.

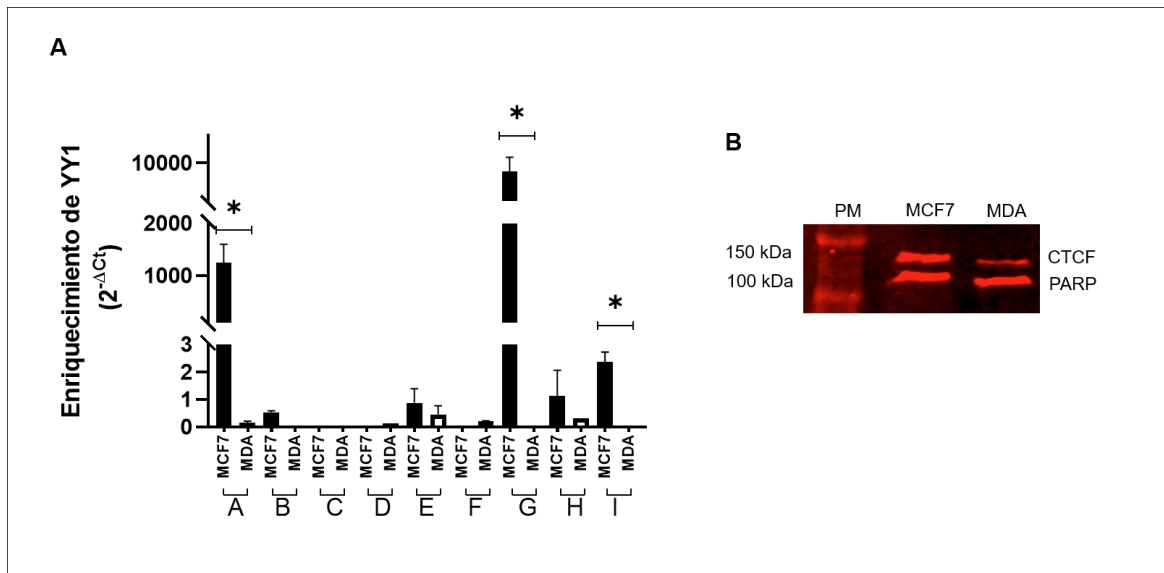


Figura 11. YY1 es capaz de unirse a sitios de unión dentro del gen CTCF en MCF-7 no así en MDA-MB-231. (A) ChIP-qPCR de YY1 en los sitios de unión seleccionados sobre el gen CTCF en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231. Las gráficas muestran el promedio del enriquecimiento (calculado con el método  $2^{-\Delta Ct}$ )  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes. \* $P < 0.05$  MCF-7 vs. MDA. (B) Expresión basal de la proteína CTCF en MCF-7 y MDA-MB-231; control de carga PARP.

Previamente, se ha reportado que la proteína CTCF se expresa en menor medida en líneas celulares de cáncer de mama con mayor potencial tumorigénico <sup>29</sup>, esto se validó por medio de western blot para analizar la expresión basal de CTCF en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 (fig. 11 B ). Se observó que

CTCF se expresa en menor medida en MDA-MB-231, se tomó como control de carga la expresión constitutiva de PARP. Por lo tanto, bajos niveles de expresión de CTCF están presentes en MDA-MB-231 la cual es considerada una línea celular con alto potencial tumorigénico, a comparación de MCF-7, que es una línea celular con bajo potencial tumorigénico <sup>7,9</sup>.

Debido a que YY1 tiene funciones como factor de transcripción y que se encontraron sitios de unión dentro y fuera del promotor de CTCF; es posible que YY1 regule de forma directa la expresión de CTCF. Para profundizar en la regulación que ejerce YY1 sobre CTCF, se realizaron ensayos de pérdida y ganancia de función.

#### **8.4 Efecto de la pérdida de función de YY1 sobre la expresión de CTCF en las líneas celulares tumorales MCF-7 y MDA-MB-231**

En los ensayos de pérdida de función (fig.12), se emplearon siRNAs específicos contra YY1. Brevemente, se transfectaron tres diseños distintos de siRNAs en las líneas celulares tumorales MCF-7 y MDA-MB-231. Después de 48 horas de haber sido transfectadas, se extrajo el RNA total y se realizaron estudios de RT-qPCR con el uso de iniciadores específicos para los genes HPRT, CTCF, YY1 (tabla 1). Adicionalmente, se repitieron las transfecciones y se extrajeron proteínas totales para realizar ensayos de western blot con el uso de anticuerpos específicos para GAPDH, CTCF y YY1.

A nivel de proteína la inhibición de YY1 condujo a la baja expresión de CTCF en ambas líneas celulares (fig. 12 A); mientras que a nivel de RNAm la inhibición de YY1 provocó el aumento de la expresión del RNAm de CTCF (fig. 12 C) en las células MDA-MB-231. En el caso de las células MCF-7, el RNAm de CTCF no mostró cambios como consecuencia de la reducción de YY1 (fig.12 B).

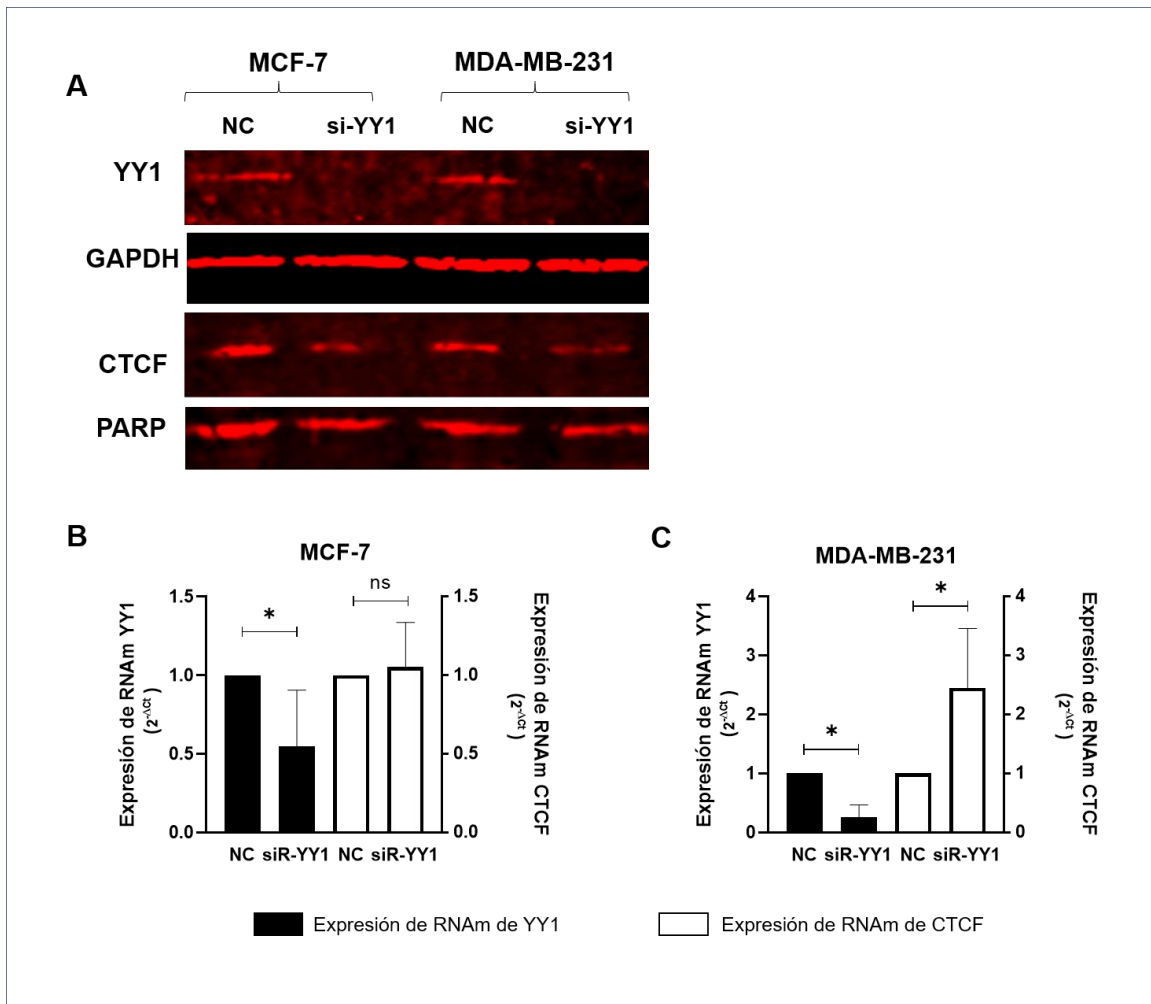


Figura 12. Efecto de la pérdida de función de YY1 sobre la expresión de CTCF a nivel de proteína (A) y RNAm (B)(C) en células MCF-7 y MDA-MB-231. La detección de proteínas se realizó con anticuerpos específicos contra YY1 y CTCF, como controles de carga GAPDH y PARP. En los ensayos de pérdida de función se emplearon siRNAs específicos contra YY1, como control siRNAs inespecíficos (NC). La cuantificación del RNAm se realizó mediante RT-qPCR. Las gráficas muestran el promedio de la expresión del RNAm (calculado con el método  $2^{-\Delta Ct}$ )  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes. \* $P < 0.05$  siRN-YY1 vs. NC.

## **8.5 Efecto de la sobreexpresión de YY1 en la expresión de CTCF en las líneas tumorales MCF-7 y MDA-MB-231**

De forma complementaria a la inhibición de la expresión de YY1, se realizaron ensayos de ganancia de función para YY1. Se transfectó el plásmido pTrex-YY1, que contiene la secuencia codificante de YY1 (fig. 6), a las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 (fig. 13). Posteriormente, se realizó la extracción de RNAm y de proteínas totales siguiendo la metodología previamente indicada.

Los ensayos de sobreexpresión de YY1 con el vector pTrex-YY1 indican que en la línea celular MCF-7 el incremento de la expresión de YY1 indujo una mayor expresión de CTCF, a nivel de proteína (fig. 13 A) no así a nivel de RNAm (fig. 13 B). En las células MDA-MB-231, a nivel de proteína, no se logró la sobreexpresión eficiente de YY1 (fig. 13 A); mientras que la sobreexpresión del RNAm de YY1 indujo el aumento significativo del RNAm de CTCF (fig. 13 C).



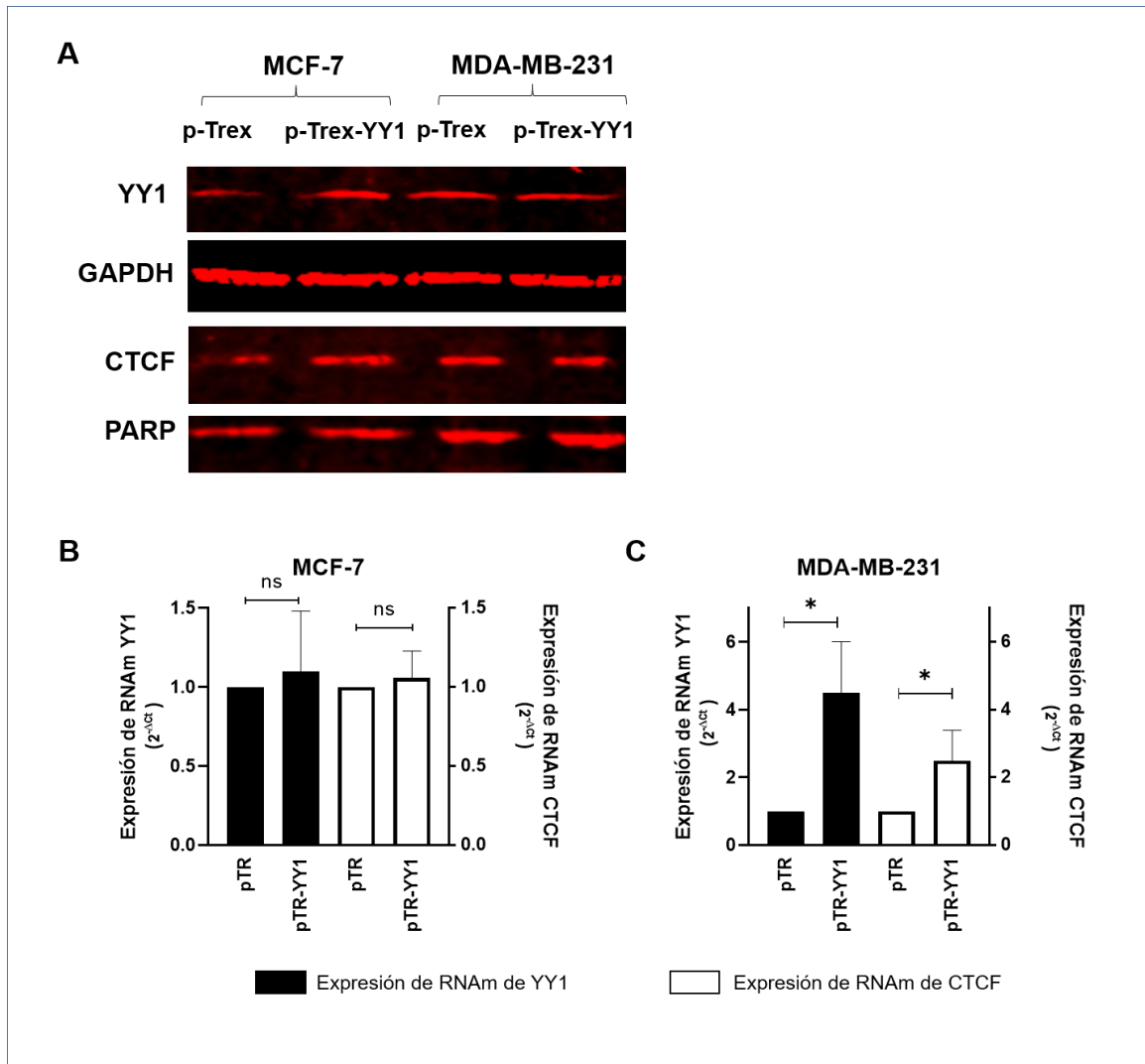


Figura 13. Efecto de la ganancia de función de YY1 sobre la expresión de CTCF a nivel de proteína (A) y RNAm (B) (C) en las células MCF-7 y MDA-MB-231. Se realizó la transfección celular con el vector de sobreexpresión pTrex-YY1 y el vector vacío pTrex como control. (A) A nivel de proteína se emplearon anticuerpos específicos contra YY1 y CTCF, los controles fueron GAPDH y PARP. (B)(C) La cuantificación del RNAm se realizó mediante RT-qPCR. Las gráficas muestran el promedio de la expresión del RNAm (calculado con el método  $2^{-\Delta Ct}$ )  $\pm$  la desviación estándar de tres experimentos independientes. \* $P < 0.05$  pTR-YY1 vs. pTR.

## 9 Discusión de resultados

CTCF es una proteína que juega un papel importante como regulador de la estructura tridimensional del genoma y como factor de transcripción por lo que se cataloga como un importante supresor tumoral <sup>29</sup>. Se ha descrito que en cáncer de mama CTCF se expresa en menor medida, a comparación de células mamarias sanas <sup>22</sup>. Estudios previos demuestran que la inhibición de CTCF promueve la tumorigenicidad, la migración y la proliferación celular, mientras que su sobreexpresión tiene el efecto contrario <sup>29</sup>. La desregulación de CTCF se asocia a un peor pronóstico <sup>14,4</sup>.

Por otra parte, YY1 es un factor de transcripción que está relacionado con la proliferación celular, la reparación del DNA, la generación de asas de cromatina etc. <sup>5</sup>. Sus múltiples funciones se deben, principalmente, a las proteínas con las que interactúa. Se ha descrito que YY1 regula la transcripción de sus genes blanco por medio de la unión directa al promotor o a través de su asociación con proteínas remodeladoras de la cromatina <sup>34</sup>. YY1 se encuentra sobreexpresado en muchos tipos de cáncer como el cáncer de próstata, el cáncer de ovario, el cáncer de mama, ente otros <sup>35</sup>. Además, el mecanismo por el cual YY1 contribuye al crecimiento de tumores es mediante la activación o represión de genes específicos <sup>5</sup>. Específicamente, en el cáncer de mama se ha reportado que YY1 se encuentra sobreexpresado, principalmente en etapas más avanzadas <sup>38</sup> y que desempeña un papel de promotor tumoral.

La figura 5 A muestra los niveles de expresión basal de la proteína CTCF en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231. Se observa que existe una menor expresión de CTCF en la línea más tumorigénica MDA-MB-231. Este resultado concuerda con un estudio previo en el cual las disfunciones de CTCF causados por mutaciones afecta la habilidad de CTCF para unirse a sus sitios promotores blanco alterando la expresión de los genes relacionados con la proliferación celular como *MYC*, *PLK*, *PIM-1*, *p19ARF*, e *Igf27H19* <sup>27</sup>. Por lo tanto, la baja expresión de CTCF detectada en las células MDA-MB-231 pudiera mimetizar en términos funcionales a

la proteína CTCF con mutaciones lo que explica el mayor potencial tumorigénico que muestra esta línea tumoral, MDA-MB-231.

Previamente se ha descrito que la inhibición de CTCF en las células MCF-7 (no metastásica) promueve la tumorigenicidad y la proliferación celular, mientras que la sobreexpresión de CTCF en las células MDA-MB-231 (metastásica) atenúa la tumorigenicidad y el crecimiento celular <sup>29</sup>. Por lo tanto, el presente trabajo de investigación pretendió identificar si YY1 estaba implicado en la regulación de la expresión de CTCF en las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.

En este estudio se propuso que CTCF pudiera ser regulado por YY1 debido a que las búsquedas bioinformáticas realizadas mostraron varios sitios de unión para YY1 a lo largo del gen CTCF (fig. 7). Estos sitios de unión putativos de YY1 se encuentran tanto en el promotor como a lo largo del gen CTCF. Posterior a la identificación de los sitios de unión, se realizó la inspección de nueve de ellos para elucidar si existe algún tipo de correlación entre la asociación de YY1 a tales sitios con los distintos niveles de expresión de CTCF mostrados entre las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231.

Los resultados de ChIP-qPCR mostraron que en la línea celular MCF-7 (fig. 11 A) existe la unión de YY1 sobre los sitios A, G e I; interesantemente, estos se encuentran en sitios distales al sitio de inicio de la transcripción (TSS) de CTCF (-41, + 105.3 y 105.6 kb del TSS, respectivamente). Posiblemente, YY1 fomente interacciones tridimensionales con los sitios diana detectados regulando la transcripción de CTCF como previamente se ha descrito para otros genes <sup>24</sup>. Contrario a esto, se encontró que en las células MDA-MB-231 (fig. 11 A); línea celular con mayor potencial tumorigénico; esas interacciones no mostraron un enriquecimiento de YY1 significativo. La diferencia entre el enriquecimiento de los sitios de unión de YY1 entre ambas líneas celulares podría justificar que en MDA-MB-231 exista una menor expresión de la proteína CTCF (fig. 11 B). Sin embargo, es necesario validar la funcionalidad de los sitios de unión diferencialmente identificados entre las líneas celulares en términos de la regulación de la expresión de CTCF.

Recientemente, se ha descrito la técnica de delección genómica mediada por el sistema CRISPR-Cas9 con el cual es posible inducir cambios genómicos de gran precisión por medio del diseño de un RNA guía que conduce a la endonucleasa Cas 9 al sitio de interés dentro del DNA en donde realizará un corte específico <sup>49</sup>. Por lo tanto, proponemos que la delección mediante el sistema CRISPR-Cas9 de los sitios de unión de YY1 identificados mediante ChIP-qPCR mostrados en la línea celular MCF-7 decrementaría la transcripción de CTCF como lo muestra la línea MDA-MB-231 en la cual hay poca expresión de CTCF y ausencia de interacción de YY1 en los sitios genómicos en cuestión. De forma similar, se identificaron sitios de unión a YY1 que regulan la expresión transcripcional del gen RAF1, los cuales fueron validados por la delección de tales sitios con el sistema CRISPR-Cas9 <sup>32</sup>.

Estos resultados sugieren, posiblemente, que YY1 al interactuar en los sitios A, G e I participen en la regulación de la transcripción de CTCF mediante la formación de un asa de cromatina que promueva la transcripción de CTCF y que por cuestiones no identificadas, YY1 no interactúa en la línea MDA-MB-231. Es importante sugerir que la transcripción basal de CTCF en MDA-MB231 pudiera estar llevándose a cabo mediante otros mecanismos; como el reclutamiento de otros factores de transcripción.

Para profundizar sobre el posible mecanismo por medio del cual el factor de transcripción YY1 regula la expresión de CTCF, se decidió estudiar el efecto de su inhibición y su sobreexpresión mediante la transfección en las líneas celulares estudiadas con siRNAs específicos para YY1 y con un vector para su sobreexpresión, respectivamente.

Mediante ensayos de pérdida de función, se encontró que en las células MCF-7 el silenciamiento de YY1 indujo una menor expresión de la proteína CTCF y en las células MDA-MB-231 se observó una disminución más visible de CTCF (fig. 12 A). Interesantemente, a nivel de RNAm, la inhibición de YY1 en la línea celular MDA-MB-231 (fig. 12 C) indujo un ligero aumento del RNAm de CTCF. Sin embargo, a nivel de proteína, la inhibición de la expresión de YY1 decrementa la expresión de CTCF en ambas líneas celulares tumorales. Este efecto podría deberse a que YY1

probablemente regule a CTCF tanto a nivel transcripcional como a nivel postranscripcional. En este sentido, se ha descrito que YY1 tiene la capacidad de actuar como un regulador negativo de proteínas, por ejemplo, YY1 regula a nivel postranscripcional a p27 al promover su ubiquitinación y posterior degradación vía proteosomal <sup>38</sup>.

Los ensayos de sobreexpresión de YY1 en las células MCF-7 el incremento de la expresión de YY1 indujo, a nivel de proteína, el aumento de CTCF (fig. 13 A) y no se observó la misma tendencia a nivel de RNAm (fig. 13 B). En las células MDA-MB-231 la sobreexpresión de YY1 indujo el aumento significativo del RNAm de CTCF (fig. 13 C); mientras que a nivel de proteína no se logró una sobreexpresión eficiente de YY1; esto sugiere que las condiciones experimentales necesitan mejorarse durante la transfección del plásmido pTrex-YY1.

Los ensayos de sobreexpresión de YY1 con el vector pTrex-YY1 indican que en la línea celular MCF-7 el incremento de la expresión de YY1 indujo una mayor expresión de CTCF, a nivel de proteína (fig. 13 A) no así a nivel de RNAm (fig. 13 B). En las células MDA-MB-231, a nivel de proteína, no se logró la sobreexpresión eficiente de YY1 (fig. 13 A); mientras que la sobreexpresión del RNAm de YY1 indujo el aumento significativo del RNAm de CTCF (fig. 13 C).

De forma importante, proponemos que YY1 no sea el único factor que regula la expresión de CTCF a nivel transcripcional. Existen diversos mecanismos adicionales que pudieran estar jugando un papel adicional a YY1 en cuanto a la regulación de la expresión de CTCF. Por ejemplo, está descrito que el factor de transcripción NFκB participa en la regulación de la expresión transcripcional de CTCF <sup>50</sup>.

## 10 Conclusiones

- Las células MDA-MB-231 muestra bajos niveles de expresión de la proteína CTCF en comparación a las células MCF-7.
- Existen sitios de unión de YY1 a lo largo del gen de CTCF en la línea celular MCF-7 y que no están presentes en las células MDA-MB-231.
- El decremento de la expresión de YY1 condujo a la disminución de la proteína CTCF en las células MDA-MB-231, línea celular de alto potencial tumorigénico.

## 11 Bibliografía

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011; 144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
2. The Global Cancer Observatory. Recuperado el 16 de marzo del 2021 en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-factsheets.pdf>
3. Chávarri-Guerra Y, Villarreal-Garza C, Liedke P. E. R, Knaul F, Mohar A, Finkelstein D. M, Goss, P. E. Breast cancer in Mexico: A growing challenge to health and the health system. *The Lancet Oncology*. 2012; 13(8):335-343. doi:10.1016/S1470-2045(12)70246-2
4. Phillips JE, Corces VG. CTCF: Master Weaver of the Genome. *Cell*. 2009; 137(7):1194-1211. doi:10.1016/j.cell.2009.06.001
5. Sarvagalla S, Kolapalli SP, Vallabhapurapu S. The Two Sides of YY1 in Cancer: A Friend and a Foe. *Frontiers in Oncology*. 2019; 9(11):10-13. doi:10.3389/fonc.2019.01230
6. Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World Journal of Clinical Oncology*. 2014; 5(3):412-424. doi:10.5306/wjco.v5.i3.412
7. Serban Comsa and Mr. The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research*. 2015; 35(1):3147-3154. Recuperado de <https://ar.iiajournals.org/content/35/6/3147>
8. Lee A, Oesterreich S, Davidson NE. MCF-7 Cells-Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years. *Journal of Natural Cancer Institute*. 2015; 107(7):73-77. doi:10.1093/jnci/djv073
9. Chavez KJ, Garimella S, Lipkowitz S. Triple negative breast cancer cell lines: One tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer. *Breast Disease*. 2010; 32(2):35-48. doi:10.3233/BD-2010-0307
10. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*. 2011; 13(4):215-222. doi:10.1186/bcr2889

11. Hadjur S, Williams LM, Ryan NK, et al. Cohesins form chromosomal cis-interactions at the developmentally regulated IFNG locus. *Nature*. 2009; 460(7253):410-413. doi:10.1038/nature08079
12. Cuddapah S, Jothi R, Schones DE, Roh TY, Cui K, Zhao K. Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. *Genome Research*. 2009; 19(1):24-32. doi:10.1101/gr.082800.108
13. Chen H, Tian Y, Shu W, Bo X, Wang S. Comprehensive identification and annotation of cell type-specific and ubiquitous CTCF-binding sites in the human genome. *PLoS ONE*. 2012; 7(7). doi:10.1371/journal.pone.0041374
14. Ong CT, Corces VG. CTCF: An architectural protein bridging genome topology and function. *Nature Reviews Genetics*. 2014; 15(4):234-246. doi:10.1038/nrg3663
15. Soto-Reyes E, Recillas-Targa F. Epigenetic regulation of the human p53 gene promoter by the CTCF transcription factor in transformed cell lines. *Oncogene*. 2010; 29(15):2217-2227. doi:10.1038/onc.2009.509
16. Klenova EM, Nicolas RH, Paterson HF, et al. CTCF, a conserved nuclear factor required for optimal transcriptional activity of the chicken c-myc gene, is an 11-Zn-finger protein differentially expressed in multiple forms. *Molecular and Cellular Biology*. 1993; 13(12):7612-7624. doi:10.1128/mcb.13.12.7612
17. Ghirlando R, Felsenfeld G. CTCF: Making the right connections. *Genes and Development*. 2016; 30(8):881-891. doi:10.1101/gad.277863.116
18. Dekker J. The three “C” s of chromosome conformation capture: Controls, controls, controls. *Nature Methods*. 2006; 3(1):17-21. doi:10.1038/nmeth823
19. Hashimoto H, Wang D, Horton JR, Zhang X, Corces VG, Cheng X. Structural Basis for the Versatile and Methylation-Dependent Binding of CTCF to DNA. *Molecular Cell*. 2017; 66(5):711-720. doi:10.1016/j.molcel.2017.05.004
20. Arzate-Mejía RG, Recillas-Targa F, Corces VG. Developing in 3D: the role of CTCF in cell differentiation. *Development (Cambridge, England)*. 2018; 145(6). doi:10.1242/dev.137729



21. Xiao T, Wallace J, Felsenfeld G. Specific Sites in the C Terminus of CTCF Interact with the SA2 Subunit of the Cohesin Complex and Are Required for Cohesin-Dependent Insulation Activity. *Molecular and Cellular Biology*. 2011; 31(11):2174-2183. doi:10.1128/mcb.05093-11
22. Oh S, Oh C, Yoo KH. Functional roles of CTCF in breast cancer. *BMB Reports*. 2017; 50(9):445-453. doi:10.5483/BMBRep.2017.50.9.108
23. Rasko JEJ, Klenova EM, Leon J, et al. Cell growth inhibition by the multifunctional multivalent zinc-finger factor CTCF. *Cancer Research*. 2001; 61(16):6002-6007.
24. Witcher M, Emerson BM. Epigenetic Silencing of the p16INK4a Tumor Suppressor Is Associated with Loss of CTCF Binding and a Chromatin Boundary. *Molecular Cell*. 2009; 34(3):271-284. doi:10.1016/j.molcel.2009.04.001
25. Méndez-Catalá CF, Gretton S, Vostrov A, et al. A novel mechanism for CTCF in the epigenetic regulation of bax in breast cancer cells. *Neoplasia (United States)*. 2013; 15(8):898-912. doi:10.1593/neo.121948
26. Fiorito E, Sharma Y, Gilfillan S, et al. CTCF modulates Estrogen Receptor function through specific chromatin and nuclear matrix interactions. *Nucleic Acids Research*. 2016; 44(22):10588-10602. doi:10.1093/nar/gkw785
27. Filippova GN, Ulmer JE, Moore JM, et al. Tumor-associated zinc finger mutations in the CTCF transcription factor selectively alter its DNA-binding specificity. *Cancer Research*. 2002; 62(1):48-52. Recuperado de <https://cancerres.aacrjournals.org/content/62/1/48>
28. Kemp CJ, Moore JM, Moser R, et al. CTCF haploinsufficiency destabilizes DNA methylation and predisposes to cancer. *Cell Reports*. 2014; 7(4):1020-1029. doi:10.1016/j.celrep.2014.04.004
29. Wu J, Li PC, Pang JY, et al. CCCTC-binding factor inhibits breast cancer cell proliferation and metastasis via inactivation of the nuclear factor-kappaB pathway. *Oncotarget*. 2017; 8(55):93516-93529. doi:10.18632/oncotarget.18977

30. Deng Z, Cao P, Wan M, Sui G. Yin Yang 1: A multifaceted protein beyond a transcription factor. *Transcription*. 2010; 1(2):81-84. doi:10.4161/trns.1.2.12375
31. Zhang Q, Stovall DB, Inoue K, Sui G. The oncogenic role of Yin Yang 1. *Critical Reviews in Oncogenesis*. 2011; 16(3-4):163-197. doi:10.1615/critrevoncog.v16.i3-4.30
32. Weintraub AS, Li CH, Zamudio A v., et al. YY1 is a Structural Regulator of Enhancer-Promoter Loops. *Cell*. 2017; 171(7):1573-1588. doi:10.1016/j.cell.2017.11.008
33. Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B. Transcription factor YY1: Structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene*. 2006; 25(8): 1125-1142. doi.org/10.1038/sj.onc.1209080
34. Kim JD, Yu S, Kim J. YY1 is autoregulated through its own DNA-binding sites. *BMC Molecular Biology*. 2009; 10(1):85-95. doi:10.1186/1471-2199-10-85
35. Atchison M, Basu A, Zaprazna K, Papasani M. Mechanisms of Yin Yang 1 in oncogenesis: the importance of indirect effects. *Critical Reviews in Oncogenesis*. 2011; 16(4):143-161. doi:10.1615/critrevoncog.v16.i3-4.20
36. Liu D, Zhang J, Wu Y, et al. YY1 suppresses proliferation and migration of pancreatic ductal adenocarcinoma by regulating the CDKN3/MdM2/P53/P21 signaling pathway. *International Journal of Cancer*. 2018; 142(7):1392-1404. doi:10.1002/ijc.31173
37. Khachigian LM. The Yin and Yang of YY1 in tumor growth and suppression. *International Journal of Cancer*. 2018; 143(3):460-465. doi:10.1002/ijc.31255
38. Wan M, Huang W, Kute TE, et al. Yin Yang 1 Plays an Essential Role in Breast Cancer and Negatively Regulates p27. *The American Journal of Pathology*. 2012; 180(5):2120-2133. doi:10.1016/j.ajpath.2012.01.037
39. Alkarain A, Slingerland J. Deregulation of p27 by oncogenic signaling and its prognostic significance in breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2004; 6(1):13-21. doi:10.1186/bcr722

40. Lee MH, Lahusen T, Wang RH, et al. Yin Yang 1 positively regulates BRCA1 and inhibits mammary cancer formation. *Oncogene*. 2012; 31(1):116-127. doi:10.1038/onc.2011.217
41. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Science*. 2004; 95(11):866-871. doi:10.1111/j.1349-7006.2004.tb02195.x
42. Beagan JA, Duong MT, Titus KR. YY1 and CTCF orchestrate a 3D chromatin looping switch during early neural lineage commitment. *Genome Research*. 2017; 27(7):1139-1152. doi:10.1101/gr.215160.116
43. UCSC Genome Browser Home. (s.f). Recuperado el 11 de enero del 2021 en: <https://genome.ucsc.edu/index.html>
44. EPD The Eukaryotic Promoter Database. Recuperado el 11 de enero del 2020 en: <https://epd.epfl.ch//index.php>
45. PROMO -ALGGEN- identification of putative transcription factor binding sites in DNA. Recuperado el 11 de enero del 2020 en: [http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo\\_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF\\_8.3](http://algggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3)
46. JASPAR - a database of transcription factor binding profiles. Recuperado el 11 de enero del 2020 en: <http://jaspar.genereg.net/>
47. Camacho B, Quevedo MA, Melendez J, et al. YY1 negatively regulates the XAF1 gene expresión in prostate cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2019; 508(3):973-979. doi:10.1016/j.bbrc.2018.12.056
48. Qiao K, Ning S, Wan L, Wu H, Wang Q, Zhang X, et al. LINC00673 is activated by YY1 and promotes the proliferation of breast cancer cells via the miR-515-5p/MARK4/Hippo signaling pathway. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2019; 38(1): 418-433. doi:10.1186/s13046-019-1
49. Neldeborg S, Lin L, Stougaard M, Luo Y. Rapid and Efficient Gene Deletion by CRISPR/Cas9. *Methods in Molecular Biology*. 2019;1961(1):233-247. doi:10.1007/978-1-4939-9170-9\_14

50. Lu L, Wang L, Li T, Wang J. NF- $\kappa$ B subtypes regulate CCCTC binding factor affecting corneal epithelial cell fate. *Journal of Biological Chemistry*. 2010; 285(13): 9373–9382. doi:10.1074/jbc.M109.094425