



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de *ETV5* en la regulación transcripcional de genes involucrados en la proliferación celular y cambios morfológicos de la línea celular secretora de insulina INS-1 (832/13)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Yael Efrén Díaz López

TUTOR PRINCIPAL
DRA. RUTH GUTIÉRREZ AGUILAR
Facultad de Medicina, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. MARCIA HIRIART URDANIVIA
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

DRA. MARINA MACÍAS SILVA
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Ciudad de México. Octubre, 2022



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

Dra. Aurora Lara Núñez

Presidenta

Dra. Myrian Velasco Torres

Secretaria

Andrea Sachi Díaz Villaseñor

Vocal

Claudia González Espinosa

Vocal

Mahara Angélica Valverde Ramírez

Vocal

Sitio donde se desarrolló el tema:

División de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México

Laboratorio de Enfermedades Metabólicas: Obesidad y Diabetes en el Hospital Infantil de México "Federico Gómez" (HIMFG)

Apoyos recibidos:

- Hospital Infantil de México "Federico Gómez" Protocolo HIM2014/056 SSA 1132
- Universidad Nacional Autónoma de México Protocolo PAPIIT IA200116
- Universidad Nacional Autónoma de México Protocolo PAPIME PE204322
- IBM a través de FUNSAED
- Programa de Becas Nacionales/ Beca de maestría CONACYT

Dra. Ruth Gutiérrez Aguilar
Tutor principal

Yael Efrén Díaz López
Sustentante

Índice general

Contenido	Página
1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1. E-veintiséis variante 5 (ETV5)	3
2.2. Regulación transcripcional de ETV5	3
2.3. Función de ETV5 en el metabolismo	4
2.4. Relación entre la proliferación celular de las células beta pancreáticas y secreción de insulina.	5
2.5. Proliferación celular	5
2.5.1. Ciclo celular	5
2.5.1.1. Fase G0	7
2.5.1.2. Fase G1	7
2.5.1.3. Fase S	9
2.5.1.4. Fase G2	10
2.5.1.5. Fase M	10
2.5.2. Relación entre ETV5, cáncer y proliferación celular	11
2.5.3. Citoesqueleto y proliferación celular	11
2.5.4. Transición epitelial-mesenquimal (EMT) y proliferación celular	12
2.5.4.1. Función de ETV5 en la transición epitelial-mesenquimal	14
3. Antecedentes	15
4. Hipótesis	20
5. Objetivos	20
5.1. Objetivo general	20
5.2. Objetivos particulares	20
6. Materiales y Métodos	21
6.1. Cultivo celular	21
6.2. Transfección	21
6.3. Extracción de RNA	22
6.4. Transcripción reversa	23
6.5. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	23

6.6. Extracción y cuantificación de proteínas	24
6.7. Western blot	25
6.8. Análisis <i>in silico</i> de las regiones promotoras de <i>E2F1</i> y <i>p27^{KIP1}</i>	26
6.9. Diseño de oligonucleótidos para amplificar las regiones promotoras de <i>E2F1</i> y <i>p27^{KIP1}</i>	27
6.10. Extracción de DNA genómico de las células INS-1 (832/13)	28
6.11. Reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR)	29
6.12. Purificación de DNA en gel de agarosa	29
6.13. Clonación en el vector pGEM-T Easy	30
6.14. Elaboración de células competentes <i>E. coli</i> XL10-Gold	31
6.15. Ensayos de transformación	31
6.16. Purificación de plásmidos	32
6.17. Digestión de DNA con enzimas de restricción	33
6.18. Subclonación en vector pGL3	33
6.19. Mutagénesis dirigida	33
6.20. Ensayo de expresión de luciferasa	34
6.21. Tinción de actina con faloidina	35
6.22. Inmunofluorescencia de marcadores de MET	36
6.23. Ensayo de herida	36
6.24. Microscopía electrónica de transmisión	37
6.25. Análisis estadístico	38
7. Resultados	39
7.1. Niveles de expresión de <i>p27^{KIP1}</i> en ausencia parcial de <i>ETV5</i>	39
7.2. Análisis <i>in silico</i> de los sitios de unión de <i>ETV5</i> a los promotores de <i>E2F1</i> y <i>p27^{KIP1}</i>	41
7.3. Amplificación de las regiones promotoras de <i>E2F1</i> y <i>p27^{KIP1}</i>	42
7.4. Clonación y subclonación de las regiones promotoras de <i>E2F1</i> y <i>p27^{KIP1}</i> a los vectores pGEM y pGL3	44
7.5. Optimización del cultivo celular y ensayo de transfección en placas de 12 pozos	44

7.6. Visualización de los plásmidos a transfectar	45
7.7. Optimización del ensayo de luciferasa	47
7.8. Actividad del promotor <i>p27^{KIP1}</i> en presencia o ausencia parcial de <i>ETV5</i>	50
7.9. Actividad del promotor <i>E2F1</i> en ausencia parcial de <i>ETV5</i>	52
7.10. Remodelación del citoesqueleto	54
7.11. Evaluación de marcadores de cambio mesenquimal-epitelial (MET)	56
7.12. Evaluación de la migración celular al silenciar parcialmente a <i>ETV5</i> en las células INS-1 (832/13)	58
7.13. Ultraestructura de las células INS-1 (832/13) al silenciar parcialmente a <i>ETV5</i>	60
8. Discusión	63
8.1. <i>ETV5</i> regula la proliferación celular vía <i>p27^{KIP1}</i> y <i>E2F1</i>	63
8.2. <i>ETV5</i> regula la proliferación celular vía cambios morfológicos (remodelación del citoesqueleto y MET)	68
8.3. <i>ETV5</i> provoca cambios morfológicos (ultraestructura)	70
9. Resumen de resultados	73
10. Conclusión	74
11. Perspectivas	76
12. Anexos	77
12.1. Gel separador de poliacrilamida 14%	77
12.2. Gel apilador de poliacrilamida 5%	77
12.3. Amortiguador de electrodos (pH=8.3)	77
12.4. Amortiguador para el cargado de proteínas (pH=6.8)	77
12.5. Amortiguador de transferencia 1X	78
12.6. Amortiguador de fosfatos (PBS) 1X (pH=7.4)	78
12.7. Amortiguador de bloqueo para membranas PVDF	78
12.8. Amortiguador para el cargado de DNA 10X	78
12.9. Gel de agarosa 1% (100 mL)	78
12.10. Solución de CaCl ₂ 100 mM (100mL)	79
12.11. Solución de CaCl ₂ 60 mM (5 mL)	79

12.12. Stock Mg ²⁺ 2M	79
12.13. Medio de cultivo caldo superóptimo con represión catabólica (SOC)	79
12.14. Medio de cultivo agar Luria Broth (LB)	80
12.15. Medio de cultivo caldo Luria Broth (LB)	80
12.16. Fijador de Karnovsky modificado	80
13. Referencias	81

Índice de figuras

Contenido	Página
Figura 1. Esquema descriptivo de la estructura de ETV5.	3
Figura 2. Transición de las fases del ciclo celular en una célula eucarionte.	7
Figura 3. Regulación del ciclo celular por E2F1.	9
Figura 4. Antecedente de la determinación de la proliferación celular en la línea celular INS-1 (832/13).	16
Figura 5. Participación de ETV5 en la regulación transcripcional de <i>E2F1</i> y <i>p27^{KIP1}</i> y cambios morfológicos de la línea celular secretora de insulina INS 1 (832/13) y planteamiento de la hipótesis.	19
Figura 6. Procedimiento de la estrategia experimental para realizar los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) y Western blot.	26
Figura 7. Vector pGEM-T Easy.	30
Figura 8. Procedimiento de la estrategia experimental para realizar los ensayos de expresión de luciferasa.	35
Figura 9. Procedimiento de la estrategia experimental para realizar los ensayos de herida, tinción de actina, tinciones inmunocitoquímicas y microscopía electrónica de transmisión.	38
Figura 10. Expresión de <i>p27^{KIP1}</i> a nivel de transcrito y proteína después de 72 horas del silenciamiento parcial de <i>ETV5</i> , en la línea celular INS-1 (832/13).	40
Figura 11. Diseño de las regiones promotoras evaluadas de <i>E2F1</i> y <i>p27^{KIP1}</i> y sus posibles sitios de unión de ETV5 mediante un análisis in silico.	42
Figura 12. Productos de PCR de los fragmentos de los promotores de <i>E2F1</i> y <i>p27^{KIP1}</i> .	43
Figura 13. Expresión relativa de <i>ETV5</i> .	45
Figura 14. Corrimiento electroforético de las construcciones de los promotores de los genes <i>E2F1</i> y <i>p27^{KIP1}</i> en el vector pGL3.	46
Figura 15. Optimización de la transfección con los vectores pRL y pGL3.	49

Figura 16. Ensayo de luciferasa para medir la actividad del promotor del gen <i>p27^{KIP1}</i> en ausencia parcial de <i>ETV5</i> .	51
Figura 17. Ensayo de luciferasa para medir la actividad del promotor del gen <i>E2F1</i> en ausencia parcial de <i>ETV5</i> .	53
Figura 18. Tinción de F-actina en las células INS-1 (832/13) después del silenciamiento parcial de <i>ETV5</i> .	55
Figura 19. Inmunotinción de marcadores MET en la línea celular INS-1 (832/13) después del silenciamiento parcial de <i>ETV5</i> a las 72 horas post-transfección.	57
Figura 20. Ensayo de herida en las células INS-1 (832/12) durante diferentes tiempos del silenciamiento parcial de <i>ETV5</i> .	59
Figura 21. Ultraestructura de las células INS-1 (832/13) después silenciar parcialmente a <i>ETV5</i> .	62
Figura 22. Propuesta de la regulación transcripcional de <i>ETV5</i> sobre los genes <i>p27^{KIP1}</i> y <i>E2F1</i> .	67
Figura 23. Resumen del estudio de <i>ETV5</i> en la regulación transcripcional de <i>E2F1</i> y <i>p27^{KIP1}</i> y cambios morfológicos de la línea celular secretora de insulina INS-1 (832/13).	75

1. Resumen

El factor transcripcional ETV5 está involucrado en el metabolismo, siendo capaz de regular genes involucrados en la exocitosis de insulina. Actualmente, se ha descrito que tanto el tamaño celular, como el número de células beta, son dos factores indispensables para que la masa de células beta sea funcional y que se pueda secretar insulina, de manera correcta. De acuerdo con esto, la regulación de la cantidad de células por medio de la proliferación celular es un mecanismo necesario para tener una adecuada masa de células beta y en consecuencia una correcta secreción de insulina.

Aunado a lo anterior, se sabe que ETV5 es capaz de aumentar la proliferación celular, encontrándose sobreexpresado en diversos tipos de cánceres. Nuestro grupo de trabajo describió que al silenciar parcialmente a *ETV5*, en la línea celular INS-1 (832/13) de células beta pancreáticas de rata, se reduce el número de células a causa de una disminución en la proliferación celular. También, se observó que al suprimir a *ETV5* el gen *E2F1* (regulador del ciclo celular) se sobreexpresa.

Se sabe que *E2F1* es capaz de regular al gen *p27^{Kip1}* (inhibidor de los complejos CDK-ciclina de la fase G1 del ciclo celular), impidiendo la proliferación celular. Por lo que en el presente trabajo, se suprimió a *ETV5* y se midió la expresión del gen *p27^{Kip1}*, encontrándose sobreexpresado tanto a nivel de transcrito como de proteína. Esto sugiere que en ausencia de *ETV5*, la sobreexpresión de *E2F1* conlleva a una mayor expresión de *p27^{Kip1}*, provocando una disminución en la proliferación de las células INS-1 (832/13). Por otro lado, mediante ensayos de luciferasa se determinó si ETV5 es capaz de regular transcripcionalmente a los genes *E2F1* y *p27^{Kip1}*. Se demostró que ETV5 se une al promotor de *E2F1*, aumentando su actividad transcripcional. Sin embargo, ETV5 no se une, ni regula directamente la transcripción del gen *p27^{KIP1}*.

Además, se evaluó la remodelación del citoesqueleto y cambios de fenotipo mesenquimal-epitelial, así como de la estructura celular, como otros mecanismos por los cuales ETV5 pudiera regular la proliferación de las células INS-1 (832/13).

Mediante tinciones contra F-actina, se encontró que la disposición y cantidades de esta proteína se modifican al disminuir a ETV5 en las células INS-1 (832/13), sugiriendo que

la polimerización de la F-actina esté provocando cambios en la división celular y la secreción de insulina.

Por otro lado, la transición de un fenotipo mesenquimal a epitelial se correlaciona directamente con una disminución de la proliferación, capacidad de migración e invasión de las células. Al silenciar parcialmente a *ETV5* en las células INS-1 (832/13), se encontró un aumento de E-cadherina (marcador epitelial) y una disminución de vimentina (marcador mesenquimal), así como una disminución de la migración celular. Entonces, en ausencia de *ETV5* sucede una transición mesenquimal-epitelial que se traduce en una menor proliferación. Además, el silenciamiento parcial de *ETV5* produjo cambios en la ultraestructura celular.

Por lo tanto, se encontró que al silenciar parcialmente a *ETV5* en las células INS-1 (832/13), aumentó la expresión de *p27^{KIP1}* y *E2F1*; sin embargo, la inhibición de la proliferación celular no se debe a la regulación transcripcional de *ETV5* sobre los promotores de estos genes. Por otra parte, se probó que *ETV5* provoca cambios morfológicos (en citoesqueleto, en la transición del fenotipo mesenquimal a epitelial y en la ultraestructura celular) que regulan la proliferación celular.

2. Introducción

2.1. E-veintiséis variante 5 (ETV5)

El factor de transcripción E-veintiséis variante 5 (ETV5) pertenece a la familia de factores de transcripción E-veintiséis (ETS), que está compuesta por 28 factores de transcripción en humanos. A su vez, estos factores están involucrados en diversos procesos celulares, tales como el desarrollo celular, la proliferación, la diferenciación, la angiogénesis y la apoptosis (A. Fry, Mallakin, y Inoue 2018).

Particularmente, ETV5 se clasifica por su estructura, dentro de la subfamilia de activadores potenciales del poliomavirus 3 (PEA3) (Oikawa y Yamada 2003; Sangphil Oh, Sook Shin 2012). La subfamilia PEA3 está conformada por tres miembros: ETV1 (ER81, en relación con E-veintiséis 81), ETV4 (E1AF o PEA3) y ETV5 (ERM). Esta subfamilia, se caracteriza por tener en una parte de los extremos amino y carboxilo, dominios ácidos de activación y en una sección del extremo carboxilo el dominio ETS (Figura 1) (Sangphil Oh, Sook Shin 2012).



Figura 1. Esquema descriptivo de la estructura de ETV5. Se presenta en gris los extremos ácidos de activación que abarcan los aminoácidos 42 al 72 y del 470 al 495. En negro se presenta la región ETS de unión al DNA, conformada por los aminoácidos 367 al 450 (Figura tomada de Sangphil Oh, Sook Shin 2012).

2.2. Regulación transcripcional de ETV5

El factor de transcripción ETV5 se une al DNA por medio del dominio conservado ETS. Se sabe que este dominio posee afinidad por la secuencia consenso 5'-GGA(A/T)-3' y que es característico de los factores ETS, regulando así la expresión génica (Eo, Song, y Lim 2012).

Además, se ha descrito que ETV5 es capaz de actuar como un activador o represor de la transcripción de genes. Esta regulación se modula a través de la interacción de ETV5

con el DNA, otros factores de transcripción y con cofactores. (Oikawa y Yamada 2003; Puli et al. 2018; Z. Zhang et al. 2009; Y. Liu y Zhang 2019).

Respecto a su función como represor, en un modelo de células progenitoras neurales, se observó que ETV5 es capaz de inhibir la transcripción del gen neurogenina-2 (*NEUROG2*), a través de su unión con un correpresor transcripcional. Se reportó que es capaz de activar mecanismos de silenciamiento de la cromatina, como desacetilación de las histonas 3 y 4 e inhibir la señal de trimetilación en la lisina 4 de la histona 3 (Y. Liu y Zhang 2019). Por otra parte, se ha visto que durante la generación de las extremidades de ratón, ETV5 puede actuar como un represor del gen *Shh*, evitando la polidactilia (Z. Zhang et al. 2009).

2.3. Función de ETV5 en el metabolismo

Nuestro grupo de trabajo ha descrito la función de ETV5 en el metabolismo, particularmente, en la homeostasis de la glucosa (Gutierrez-Aguilar et al. 2014).

A través de distintas aproximaciones *in vivo*, dónde se compararon ratones silvestres contra ratones *knockout* para *ETV5* (*ETV5 KO*), se encontró que los ratones *ETV5 KO* tienen un menor peso, tamaño, masa magra y masa grasa, resultando ser más delgados que los ratones silvestres (Gutierrez-Aguilar et al. 2014).

Por otro lado, se encontró que los ratones *ETV5 KO* son más sensibles a la insulina y sorprendentemente son intolerantes a la glucosa, presentando un páncreas con un menor número y tamaño de islotes de Langerhans, así como una tendencia a la disminución de masa de células beta (Gutierrez-Aguilar et al. 2014).

Respecto a la intolerancia a la glucosa que presentaron los ratones *ETV5 KO*, se comprobó que tienen disminuida la secreción de la insulina y ese fenómeno se debe al control transcripcional de *ETV5* sobre la expresión de genes involucrados en la exocitosis de la insulina (Gutierrez-Aguilar et al. 2014).

2.4. Relación entre la proliferación celular de las células beta y secreción de insulina.

Se ha descrito que tanto el tamaño como el número de células beta son dos factores indispensables para que la masa de células beta sea funcional y haya una buena secreción de insulina. De acuerdo a lo anterior, la regulación en la cantidad de células, mediada a través de la proliferación celular, es un mecanismo necesario para que haya una adecuada masa de células beta y así, una apropiada secreción de insulina (Szabat et al. 2016; Böni-Schnetzler et al. 2018). De manera interesante, se observó que en los ratones *ETV5* KO existe una tendencia a la disminución en la masa de células beta y hay una disminución de la secreción de insulina (Gutierrez-Aguilar et al. 2014).

Por otra parte, en las células de insulinoma de rata INS-1 (832/13), al silenciar a *ETV5*, se disminuyó el número de células y la proliferación celular, presentando reducción en la secreción de insulina (Díaz-López 2020).

Actualmente, se desconoce si existe una relación entre la función de *ETV5* a nivel de metabolismo (secreción de insulina) y su función en cáncer (proliferación celular). Particularmente, estos antecedentes sugieren que *ETV5* pudiera estar controlando la secreción de insulina, mediante el control de la proliferación celular. Por lo que esto es el tema central que aborda el presente trabajo.

2.5. Proliferación celular

La proliferación celular involucra una secuencia de pasos que requieren de un ambiente adecuado para que se incremente el número de células, por medio de la duplicación de su material genético, crecimiento y división. Este proceso tiene diferentes etapas (Feitelson et al. 2016)

2.5.1. Ciclo celular

El ciclo celular es un proceso complejo que involucra una serie de etapas o fases, a través de las cuales, una célula madre se divide en dos células hijas idénticas (I. Evan y H. Vousden 2001).

El ciclo celular es regulado a través de puntos de monitoreo. Estos puntos de monitoreo son controlados principalmente por la función de los complejos de cinasas dependientes de ciclina (CDK) unidos a sus ciclinas, lo cual por medio de la fosforilación de proteínas blanco, asegura que el ciclo celular ocurra en el tiempo y orden adecuados. Cuando se detecta un error en alguna etapa del ciclo celular, este se detiene por medio de un cambio en la cantidad de complejos CDK-ciclina, impidiendo la proliferación (Wenzel y Singh 2018).

Los puntos de monitoreo suceden a nivel de la transición G1/S (punto de monitoreo de restricción), en la transición G2/M (punto de monitoreo de la replicación del DNA) y en la transición de metafase/anafase (punto de control del huso mitótico) (Wenzel y Singh 2018).

De manera global, el ciclo celular se puede describir a través de los eventos que ocurren en cinco diferentes etapas o fases que son: G0, G1, S, G2 y M (Figura 2) (Ivanchuk et al. 2004).

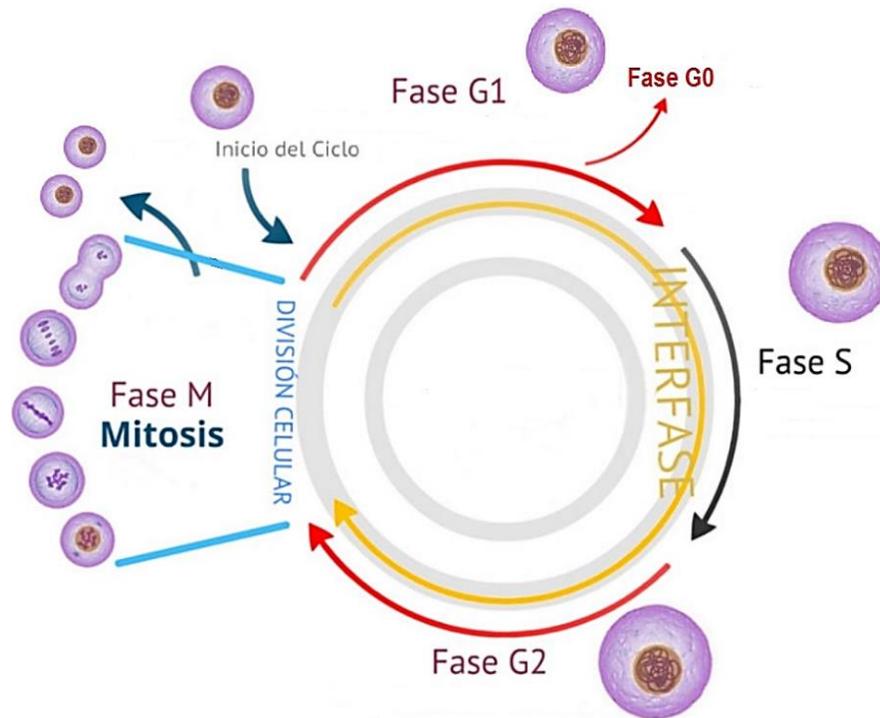


Figura 2. Transición de las fases del ciclo celular en una célula eucarionte. La fase G0 se describe como un estado de quiescencia. En la fase G1, la célula crece y se alista para la síntesis del DNA. En la fase S, el DNA se duplica. Durante la fase G2, la célula se prepara para la división celular. Por último, en la fase M se originan dos células hijas idénticas (Menéndez Valderrey, J. L. 2019).

2.5.1.1. Fase G0

En la fase G0 la célula permanece en un estado de reposo o quiescencia (Wenzel y Singh 2018). Durante esta fase, se reprime la transcripción de genes necesarios para la duplicación del ácido desoxirribonucleico (DNA) y activación de la mitosis. Además, se aumenta la expresión de genes antiapoptóticos, antisenescencia y antidiferenciación (Cook y Matson 2017).

2.5.1.2. Fase G1

En la fase G1, las células se preparan para la duplicación del DNA acumulando proteínas y aumentando su tamaño. Durante esta etapa, se estimula la expresión de ciclinas tipo D, a través de señales reguladas por la presencia de factores de crecimiento (Bertoli, Skotheim, y De Bruin 2013).

En presencia de mitógenos, se desencadena una serie de eventos de fosforilación, los cuales son regulados por CDK, que tienen una conformación activa al unirse con ciclinas (Bertoli, Skotheim, y De Bruin 2013).

En estado temprano de G1, la cinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4) y la cinasa dependiente de ciclina 6 (CDK6) se activan y tienen unión específica a ciclinas tipo D. En contraste, la cinasa dependiente de ciclina 2 (CDK2) actúa en un estado tardío de G1, uniéndose a ciclina E y ciclina A. Estos complejos son capaces de fosforilar a la proteína del retinoblastoma (RB), lo cual provoca la separación de los complejos entre RB y proteínas que son necesarias para el ciclo celular (Ivanchuk et al. 2004).

La proteína RB hipofosforilada se mantiene unida a los miembros de la familia E2F, inhibiendo así su función como factor transcripcional. Por otra parte, la fosforilación de RB por los complejos CDK-ciclina, libera a E2F, lo que permite que se transcriban genes requeridos para la síntesis del DNA y la transición de la fase G1 a S (Giacinti y Giordano 2006).

Por otro lado, una forma en la que se regulan los complejos CDK-ciclina, sucede por medio de su unión con inhibidores de CDK, estableciendo una regulación estricta del ciclo celular. Los integrantes de familia de inhibidores de CDK4 y CDK6 (INK4) son: p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}. Estas proteínas se unen a CDK4 y CDK6, evitando su unión a ciclinas tipo D, lo que inhibe su actividad de cinasa. Por otro lado, los miembros de la familia de proteínas de interacción con CDK/proteínas inhibidoras de cinasa (CIP/KIP) son: p21^{CIP1}, p27^{KIP1} y p57^{KIP2}, los cuales son capaces de unirse a diferentes complejos CDK-ciclina, inhibiendo la actividad de estas cinasas (Besson, Dowdy, y Roberts 2008).

Se sabe que E2F1 puede actuar como un activador del ciclo celular (Black y Azizkhan-Clifford 1999). Sin embargo, se ha descrito un mecanismo no convencional en el que E2F1 es capaz de detener el avance del ciclo celular. Se ha reportado que, en diversos modelos de estudio E2F1 puede promover la expresión de p27^{KIP1} por unión directa a su región promotora (Figura 3). Se ha demostrado que al sobreexpresar a E2F1 hay una mayor presencia de p27^{KIP1}, lo que causa que el ciclo celular se detenga en la fase G1 (Wang et al. 2005; Duan et al. 2017; Luo et al. 2017)

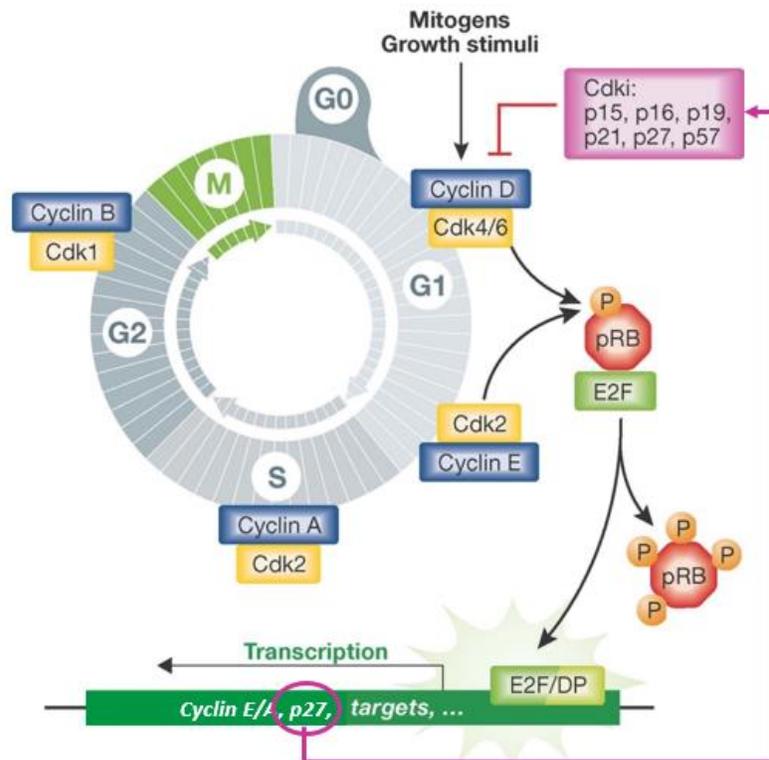


Figura 3. Regulación del ciclo celular por E2F1. Durante la transición G1/S los complejos de ciclina D-Cdk4/6 y ciclina E-Cdk2 fosforilan a RB, liberando a E2F1 el cual regula la expresión de genes que regulan el ciclo celular, entre ellos se encuentra *p27^{KIP1}*, un inhibidor del complejo CDK-ciclina (modificación de Aguilar y Fajas 2010).

2.5.1.3. Fase S

En la fase S, se duplica el contenido de DNA resultando en la obtención de dos copias del material genético que recibirán las células hijas (Jain et al. 2015).

El avance de la fase G1 a S es regulado durante el estado tardío de G1, por los complejos CDK2-ciclina E y CDK2-ciclina A, los cuales permanecen activos durante la fase S. Estos complejos mantienen a RB fosforilado, lo que permite que E2F transcriba a sus genes blanco (Du et al. 2016).

2.5.1.4. Fase G2

Durante esta fase, las células se alistan para realizar la mitosis y la división celular. Se verifica que el nuevo material genético no contenga mutaciones y que se cuente con la maquinaria necesaria para la siguiente etapa. Una forma en la que se detecta el daño al DNA durante esta etapa, es por activación de la proteína relacionada a rad3 y ataxia telangiectasia (ATR), la cual fosforila y activa a la proteína cinasa punto de monitoreo cinasa 1 (Chk1). Por otro lado, Chk1 puede activar a la proteína ciclo de división celular 25A (cdc25A), y a la proteína tumoral 53 (p53), impidiendo que se lleve a cabo la mitosis (Oakes et al. 2014; Smith et al. 2020).

En la transición de la fase S a G2, se ensamblan los complejos CDK1-ciclina B. Además, se disminuye la actividad de CDK2/ciclina E, complejo de G1/S. Este se inactiva por la degradación de ciclina E, mediado por ubiquitinación (Ivanchuk et al. 2004).

2.5.1.5. Fase M

En la fase M, la célula divide de manera equivalente su material genético y componentes, originando a dos células hijas idénticas (Lara-Gonzalez, Westhorpe, y Taylor 2012).

Durante la transición G2 a M existe la formación de nuevos complejos CDK-ciclina importantes para el inicio, progresión y término de la fase M. El complejo CDK1-ciclina B participa en la activación del complejo promotor de la anafase (APC), en la descomposición de la envoltura nuclear y en el montaje del huso mitótico (Lara-Gonzalez, Westhorpe, y Taylor 2012).

Por otra parte, la separasa se considera un blanco crítico del control mitótico. Esta es una proteasa que desencadena la anafase por rompimiento del homólogo de proteína rad21 de reparación de doble hebra (hRad21), proteína que a su vez, se mantiene unida a las cromátidas hermanas (Ivanchuk et al. 2004). La proteína separasa se conserva inactiva por asociación con la segurina. Cuando se activa el complejo APC uniéndose con el homólogo de proteína 20 del ciclo de división celular (cdc20), sucede la degradación de segurina por ubiquitinación, lo cual da inicio a la anafase (Ivanchuk et al. 2004).

2.5.2. Relación entre ETV5, cáncer y proliferación celular

Se ha reportado que los integrantes de la familia ETS, participan en diversos mecanismos fisiológicos y del desarrollo. Algunos de ellos son: la proliferación, el control del ciclo celular, la apoptosis, la diferenciación, la remodelación del tejido y la angiogénesis (Sizemore et al. 2017).

Se ha descrito que ETV5 se encuentra sobreexpresado en diversos tipos de cánceres, tales como cáncer de esófago, leucemia, cáncer de cabeza y cuello, linfoma, melanoma, entre otros. Los mecanismos de acción de ETV5 para el desarrollo de cáncer involucran: el aumento en la proliferación celular, la promoción de angiogénesis y la inducción de la migración celular (Cheng et al. 2019; Feng et al. 2019).

Por ejemplo, se ha observado que en cáncer de tiroides papilar, ETV5 se encuentra sobreexpresado y se relaciona con el crecimiento y proliferación celulares. Además, se describió que su expresión se regula río abajo de la vía de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) e interviene en la sobreexpresión del factor de transcripción 1 twist básico hélice-bucle-hélice (TWIST1), un marcador de infiltración vascular y metástasis (Puli et al. 2018).

En el caso de un modelo *in vitro* de cáncer de vejiga, se reportó que ETV5 se encuentra sobreexpresado y aumenta la proliferación, regulando la expresión de la proteína tafazzina (TAZ), que en conjunto con el homólogo de la proteína Yorkie (YAP1) promueven la transcripción de genes antiapoptóticos y de proliferación celular (di Martino et al. 2019).

2.5.3. Citoesqueleto y proliferación celular

Por otra parte, se sabe que el citoesqueleto es una estructura de la célula fundamental para que se lleve a cabo la proliferación celular. El citoesqueleto está compuesto por microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos, los cuales son proteínas de soporte que otorgan a las células una morfología determinada. Además, estas proteínas participan en la regulación dinámica de diversas funciones celulares como: proliferación celular, adhesión, contractilidad, migración y polarización (Dugina, Shagieva, y Kopnin 2019; Heng y Koh 2010).

La actina es una proteína globular del citoesqueleto, la cual se ordena en filamentos formando estructuras de andamiaje a través de su polimerización. Esta proteína se encarga de estructurar la forma de las células, darles un soporte de tensión, regular el transporte vesicular, la adherencia celular y la movilidad. Además, la actina tiene un papel en la transducción de señales durante la transición del ciclo celular (Heng y Koh 2010; Jones, Zha, y Humphries 2019).

En el caso de las células INS-1 (832/13), se ha descrito que, al estimular las células con glucosa, sucede una remodelación de las redes de actina, liberando su interacción con el complejo de receptores de proteínas de fijación soluble en N-etilmaleimida (SNARE) a nivel de syntaxina 1A y de la proteína asociada a sinaptosoma 25 (SNAP-25). Además, se encontró que en condiciones glucotóxicas, se impide la remodelación de la F-actina a nivel de la membrana citoplasmática, lo que provoca que haya una menor secreción de insulina (Quinault et al. 2016).

Por otra parte, se ha reportado que un exceso en la polimerización de F-actina, causa un incremento de células multinucleadas como consecuencia de fallas en la citocinesis, disminuyendo la proliferación (Moulding et al. 2007; Heng y Koh 2010).

Lo anterior apunta a la necesidad de mantener una correcta dinámica en la polimerización de esta proteína, para que pueda ocurrir la proliferación celular y la secreción de insulina.

2.5.4. Transición epitelial-mesenquimal (EMT) y proliferación celular

El cambio EMT se describe como una reprogramación celular, en la cual las células epiteliales sufren pierden su identidad y morfología, adquiriendo características mesenquimales, lo cual sucede a través de cambios transcripcionales y epigenéticos. Actualmente, se sabe que este proceso es reversible y que también puede suceder la transición mesenquimal-epitelial (MET), mecanismo empleado principalmente en diferentes etapas de la morfogénesis y organogénesis del plano corporal de metazoarios (Kalluri y Weinberg 2009; Pei et al. 2019).

Durante el cambio EMT, las células pasan de tener una forma redonda y de mayor adherencia a tener una forma elongada y con pérdida de la adherencia, también se

aumenta la expresión de algunos marcadores característicos como N-cadherina, fibronectina y vimentina, así como la expresión de factores de transcripción como *Zeb1/2*, *Twist1/2* y *Snail1* (Pastushenko y Blanpain 2019)

De manera convencional, este proceso se observa durante el desarrollo de un organismo, la recuperación de una herida y durante un proceso de fibrosis (Georgakopoulos-Soares et al. 2020). Por otra parte, también puede ser utilizado por células tumorales durante el desarrollo de cáncer. Particularmente, durante el proceso de metástasis se favorece el desprendimiento de células del tumor primario, de tipo mesenquimal, lo que le otorga capacidad migratoria a las células. Además, este tipo de células mesenquimales promueven mecanismos de remodelación de matriz extracelular, haciendo que las células adquieran capacidad invasiva (Yilmaz y Christofori 2009).

Las células epiteliales se caracterizan por tener un fenotipo con mayor cantidad de uniones célula-célula, una polaridad apical-basal, tener una menor migración y disminución en la proliferación celular. Algunos marcadores característicos de estas células son: E-cadherina, citoqueratinas, ocludinas y claudinas (Beuran et al. 2015).

Por otra parte, las células mesenquimales, poseen un fenotipo en el que se pierde la polaridad, poseen mayor migración y un aumento de la proliferación celular. Estas células pueden ser identificadas por los marcadores: N-cadherina, fibronectina y vimentina (Beuran et al. 2015).

Actualmente, se sabe que las vías de señalización de Hedgehog (Hh) y Notch, se relacionan con la diferenciación y función celular pancreática, teniendo un papel en el cambio EMT. Por una parte, se ha descrito que al eliminar la señalización de Hh, en ratones deficientes del receptor miembro 11 de la familia Frizzled (*Smo*), se retarda la formación del páncreas y hay una menor cantidad de células beta, así como una mala producción de insulina en los ratones adultos (Lau y Hebrok 2010). Respecto a la vía Notch, se sabe que influye en la diferenciación de las células exocrinas y endocrinas del páncreas. Se ha descrito que al irrumpir la vía Notch, se incrementa la expresión de *ngn3*, lo cual dirige el destino de las células a diferenciación endocrina. En condiciones

normales de la vía Notch, se observó una expresión de HES-1 y p48, lo cual favorece la diferenciación exocrina (Apelqvist et al. 1999).

2.5.4.1. Función de ETV5 en la transición epitelial-mesenquimal

ETV5 ha sido estudiado en el proceso de EMT en modelos de cáncer, tales como carcinoma endometrial y cáncer tiroideo (Alonso-Alconada et al. 2014; Colas et al. 2012; Meng et al. 2020).

En el modelo de cáncer endometrial, la sobreexpresión de *ETV5* promueve el cambio EMT y favorece la expresión del *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), el cual es indispensable en el desarrollo de metástasis mediada por ETV5 (Alonso-Alconada et al. 2014). Por otra parte, se encontró que ETV5 es capaz de regular la expresión del factor de transcripción Zeb1 y E-cadherina, provocando la reorganización del contacto entre células y sustratos, favoreciendo la migración celular. En este mismo estudio, se reportó que la proteína pareja preferida de lipoma (LPP), actúa junto con *ETV5* como transductor de señales extracelulares, favoreciendo la invasión celular (Colas et al. 2012).

Por otro lado, se ha reportado que ETV5 funciona como un potenciador del desarrollo de cáncer tiroideo, promoviendo el crecimiento, migración y el cambio EMT. Se describió que ETV5 se sobreexpresa en células de este modelo de cáncer y que esto puede ser estimulado vía el receptor de estrógenos α (ER α). Además, ETV5 puede aumentar la transcripción de la subunidad catalítica α del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3 cinasa (codificada por el gen (*PI3KCA*), activando la vía de fosfatidilinositol 3 cinasa/ proteína cinasa B (PI3K/AKT) (Meng et al. 2020).

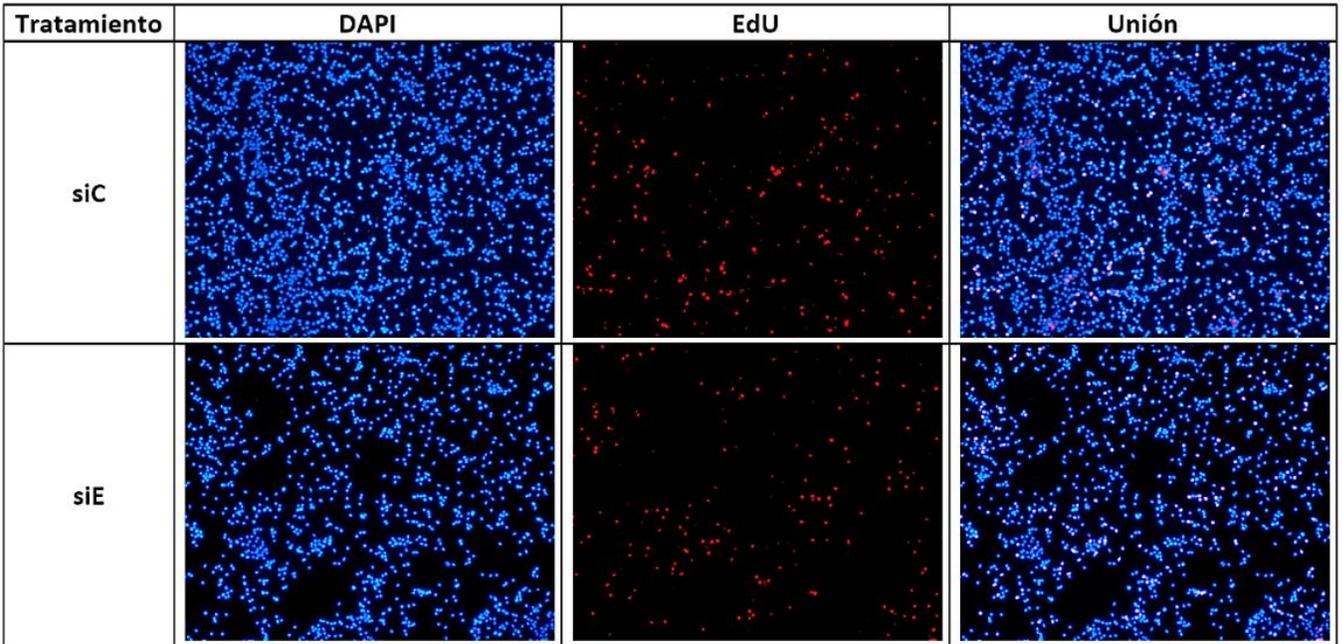
Las ideas anteriores señalan directamente a ETV5 como una proteína capaz de promover la EMT en el caso de diferentes cánceres. Por lo que al silenciar a *ETV5* en las células INS-1 (832/13), el resultado esperado es que se provoque el proceso inverso, es decir MET, proceso que se estudiará en este trabajo.

3. Antecedentes

En ensayos realizados por nuestro grupo de trabajo, se observó que al suprimir al gen *ETV5* en la línea celular INS-1 (832/13) hay una disminución en la secreción de insulina. Esta disminución se debe a que ese factor es capaz de regular transcripcionalmente al gen de la proteína asociada al sinaptosoma 25 (*snap25*), *sinaptotagmina VII* y *sinaptotagmina IX*, genes involucrados en la exocitosis de la insulina (Gutierrez-Aguilar et al. 2014).

Posteriormente, se observó que al disminuir el RNAm de *ETV5* en las células INS-1 (832/13), por medio de un siRNA, el número de células disminuye respecto a las células control. Para estudiar la disminución en el número de células, se analizó la viabilidad, apoptosis y proliferación de las células transfectadas con el siRNA *ETV5* o con un siRNA control. Se encontró que la viabilidad y apoptosis no se ven afectadas. Sin embargo, al analizar la proliferación celular, por medio de un ensayo de incorporación de 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU), se observó que la proliferación se redujo en un 23%, después del silenciamiento parcial de *ETV5* (Figura 4), comprobando su papel en proliferación celular (Díaz-López 2020).

A)



B)

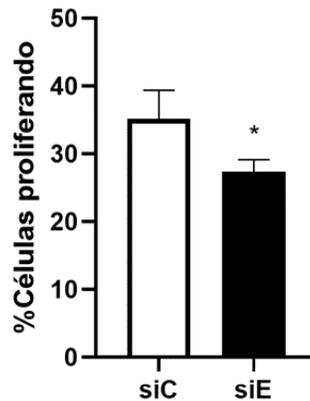


Figura 4. Antecedente: Disminución de la proliferación celular en la línea celular INS-1 (832/13). (A) Evaluación de la proliferación con el marcador 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU) en células transfectadas con siC (siRNA control) y siE (siRNA ETV5). Se muestra los núcleos teñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, en azul) y la tinción con EdU (de color rojo). También se muestra la unión de ambas imágenes, en donde las células proliferantes se marcan con puntos rosas. (B) Cuantificación de la proliferación en células transfectadas con siC y siE, se muestra en porcentaje el cociente de la cantidad de células EdU positivas entre la totalidad de células teñidas con DAPI. T-Student, * $p < 0.05$, $n = 3$. Los resultados se presentan como el promedio \pm SEM. Figura tomada de Díaz-López 2020.

Además, se analizaron posibles genes blanco de *ETV5*, cuyos productos regulan el ciclo celular, como: la ciclina D2 (*CCND2*), la proteína ribosomal S6 cinasa 1 (*S6K1*) y el factor de transcripción 1 E2F (*E2F1*) (Díaz-López 2020).

Se encontró que al silenciar parcialmente a *ETV5*, la expresión de *CCND2* y *S6K1* no se ve afectada. Sin embargo, el gen *E2F1* se encontraba sobreexpresado a nivel de transcrito y proteína (Díaz-López 2020). Por otra parte, se ha reportado que el gen *E2F1* es capaz de regular transcripcionalmente al gen *p27^{KIP1}*, el cual es un inhibidor del ciclo celular (Luo et al. 2017). Por lo que para este proyecto, se quiere comprobar que al suprimir a *ETV5*, la disminución en la proliferación celular se deba a la sobreexpresión de *E2F1*, que podría estar aumentando los niveles de *p27^{KIP1}* y así inhibir la proliferación celular. Además, se analizará si *ETV5* es capaz de unirse al promotor de *E2F1* o *p27^{KIP1}*, actuando como un represor de la vía *E2F1- p27^{KIP1}* y regula la actividad transcripcional de estos genes (Figura 5).

Por otra parte, en este trabajo se quiso comprobar si la disminución de la proliferación celular en ausencia de *ETV5* se debe a cambios morfológicos que pudieran estar sucediendo en la línea celular INS-1 (832/13).

Previamente, se había demostrado en el modelo de ratones *ETV5* KO, que tanto la morfología, como el tamaño de los islotes pancreáticos, se ven afectados por el silenciamiento de este gen. Al realizar una inmunotinción para detectar las células beta pancreáticas, se encontró que estas células muestran con una mayor agrupación y un menor tamaño, respecto a los ratones silvestres (Gutierrez-Aguilar et al. 2014).

Para abordar esta parte del trabajo, primero se observará si al silenciar parcialmente a *ETV5* en las células INS-1 (832/13) hay cambios en el estado del citoesqueleto, evaluando la disposición y cantidad de F-actina (Figura 5). Lo anterior se realizará para evidenciar si existe una modificación en la polimerización de actina, ya que se sabe que esto puede afectar tanto la secreción como la proliferación celular (Jones, Zha, y Humphries 2019; Quinault et al. 2016).

Posteriormente, se estudiará si al disminuir a *ETV5* en las células INS-1(832/13), se presenta una transición mesenquimal a epitelial. Se sabe que las células con fenotipo

epitelial presentan una mayor cantidad de proteínas de unión entre células, favoreciendo su unión y restándoles movilidad, además de tener una menor proliferación, comparadas con las células de fenotipo mesenquimal (Beuran et al. 2015). Esto se evaluará evidenciando la presencia de marcadores de fenotipo mesenquimal y epitelial, así como evaluando la migración celular (Figura 5).

Finalmente, se quiso estudiar por ultramicroscopia la estructura de las células INS-1 (832/13) al disminuir a *ETV5*. Lo anterior, se realizará para poder visualizar posibles cambios internos en la células, que pudieran relacionarse a cambios en la proliferación y secreción de insulina (Figura 5).

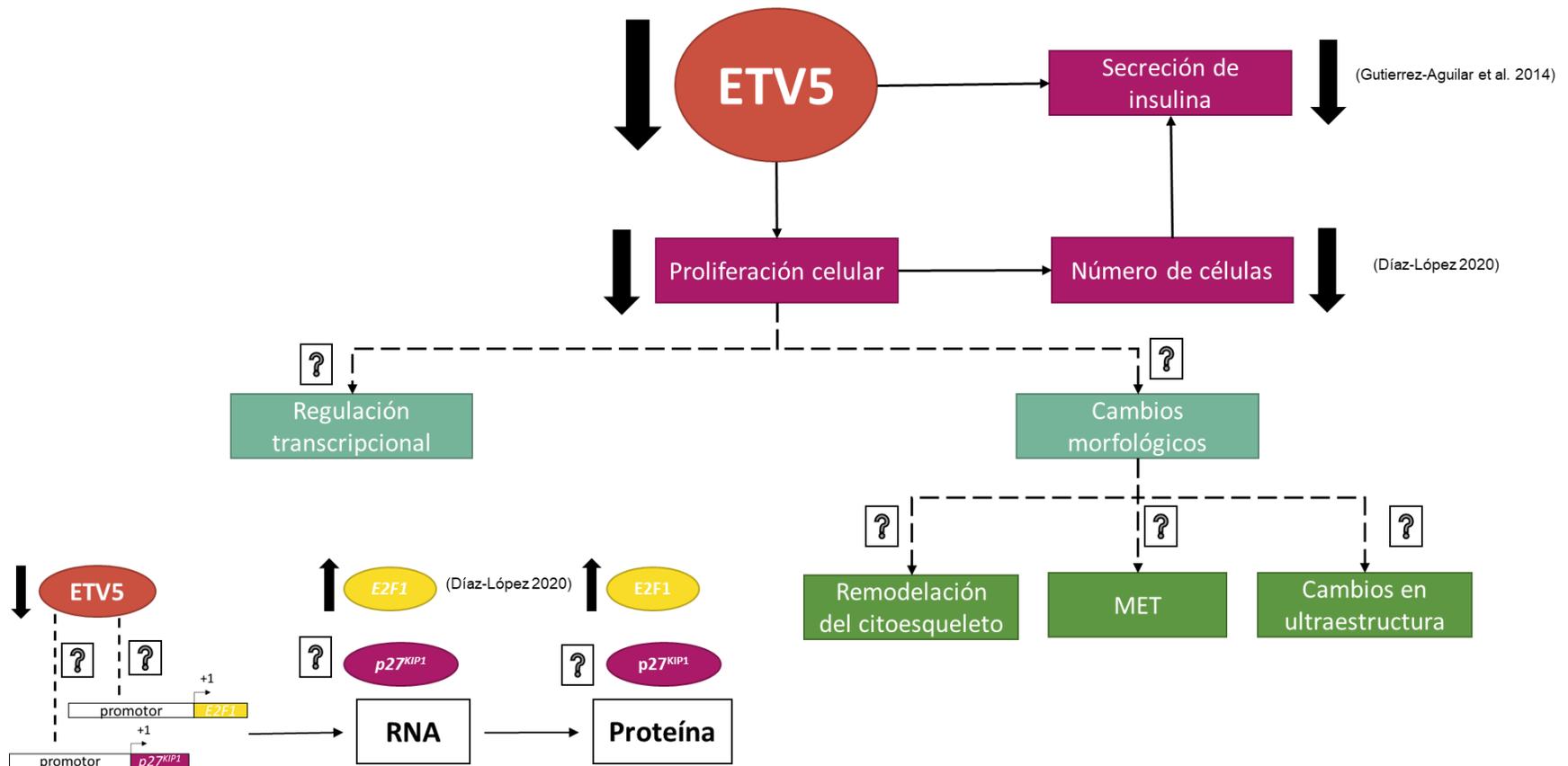


Figura 5. Participación de ETV5 en la regulación transcripcional de *E2F1* y *p27^{KIP1}* y cambios morfológicos de la línea celular secretora de insulina INS 1 (832/13) y planteamiento de la hipótesis. Al silenciar parcialmente a *ETV5* en las células INS-1 (832/13), se disminuye la secreción de insulina. Además, se disminuye el número de células y la proliferación celular. En este trabajo se evaluó si el silenciamiento parcial de *ETV5* disminuye la proliferación de las células INS-1 (832/13), por medio de la regulación transcripcional de *E2F1*-*p27^{KIP1}* y/o si sucede mediante cambios morfológicos en las células (remodelación del citoesqueleto, transición epitelial mesenquimal (MET) y cambios de estructura).

4. Hipótesis

Al silenciar a *ETV5* en la línea celular INS-1 (832/13), se reduce la proliferación celular por medio de dos posibles mecanismos: 1) el aumento de la expresión de *E2F1* y *p27^{KIP1}* por regulación transcripcional directa de sus regiones promotoras, y 2) induciendo cambios morfológicos a nivel de citoesqueleto, en la transición del fenotipo mesenquimal a epitelial y cambios de estructura celular.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Averiguar si la participación de *ETV5* en la disminución de la proliferación celular de las células INS-1 (832/13) ocurre a través de la regulación transcripcional de *E2F1* o *p27^{KIP1}* y por cambios morfológicos (citoesqueleto, fenotipo mesenquimal a epitelial y de estructura celular).

5.2. Objetivos particulares

- ❖ Medir la expresión de *p27^{KIP1}* cuando se silencia parcialmente a *ETV5*.
- ❖ Analizar la regulación transcripcional de *ETV5* sobre los promotores de los genes *E2F1* y de *p27^{KIP1}*:
 - a) Analizar *in silico* los sitios de unión de *ETV5* a los promotores de *E2F1* y de *p27^{KIP1}*.
 - b) Clonar los promotores de *E2F1* y de *p27^{KIP1}* en un vector de clonación (pGEM).
 - c) Subclonar dichos promotores a un vector de expresión de luciferasa (pGL3).
 - d) Optimizar la cotransfección del siRNA contra *ETV5* y del vector pGL3 con las secuencias promotoras.
 - e) Realizar ensayos de expresión de luciferasa de los promotores de *E2F1* y de *p27^{KIP1}* en células que expresen o no a *ETV5*.
- ❖ Analizar la remodelación del citoesqueleto por medio de tinciones de F-actina.

- ❖ Analizar la transición de fenotipo mesenquimal-epitelial.
 - a) Evaluar la presencia de los marcadores de transición mesenquimal-epitelial, vimentina y E-cadherina.
 - b) Evaluar la migración celular por medio de ensayos de herida.
- ❖ Analizar la ultraestructura de las células INS-1 (832/13) para ver los cambios morfológicos en presencia y ausencia de *ETV5*.

6. Materiales y Métodos

6.1. Cultivo celular

Los ensayos se realizaron con la línea celular INS-1 (832/13) entre los pasajes 26 y 34. La incubación de las células se realizó a 37°C, con 5% de CO₂, en ambiente húmedo. Se utilizó medio de cultivo RPMI-1640 (SIGMA R8758) suplementado con: FBS (suero fetal bovino) inactivado por calor al 10% (GIBCO 10082), 2- mercaptoetanol 0.05 mM (GIBCO 21985023), L-glutamina 2 mM (GIBCO 25030-081), amortiguador HEPES 10 mM (GIBCO 15630-080), piruvato sódico 1mM (SIGMA S8636), y penicilina-estreptomicina 100 U/mL-10mg/mL (HyClone™ SV30010).

Como actividad académica extracurricular, se realizó un video en el que se muestra el procedimiento de esta técnica. Este se puede consultar a través de: <https://youtu.be/PRF1vgNQFFs>.

6.2. Transfección

Para estos ensayos, se transfectaron a las células INS-1 (832/13) con un RNA corto de interferencia (siRNA), el cual es una molécula de RNA bicatenario de 20 a 30 nucleótidos. El siRNA se une al complejo de RNA inductor de silenciamiento (RISC) y al transcrito del gen de interés, ocasionando que RISC degrade al mRNA del gen blanco (Dana et al. 2017).

Para transfectar las células, se plaquearon 6×10^5 células por pozo en cajas de 6 pozos. Se incubó por 24 h y se transfectó con 20 nM de siRNA control (siC, Dharmacon™ D-

001810-10-05) o con 20 nM de siRNA *ETV5* (siE, Dharmacon™ L-087219-02). Se utilizó el agente de transfección (Thermo Scientific T-2001-02) y se siguió el protocolo indicado por el proveedor.

Por cada 99 μ L de medio sin suplementos, se colocó 1 μ L de agente de transfección y se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente (tubo A). Por separado, se colocó 1 μ L de siC y en otro tubo el siE en 99 μ L de medio sin suplementos (tubos B) y se dejaron incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se mezcló la disolución de agente transfectante con la de los siRNAs (A+B) en proporción 1:1 y se incubó por 20 minutos. Posteriormente, se incubaron a las células con 1.8 mL de medio suplementado y 200 μ L de la preparación de los siRNAs, durante 72 horas.

Como actividad académica extracurricular, se realizó un video en el que se muestra el procedimiento de esta técnica. Este se puede consultar a través de: <https://youtu.be/pWfkX5xwLK8>.

6.3. Extracción RNA

Este ensayo se realizó utilizando un estuche de purificación de ácido ribonucleico (RNA) total (Jena Bioscience PP-210S).

Primero, se colectaron las células transfectadas y se colocaron en hielo. Posteriormente, se agregaron 500 μ L de amortiguador de lisis con 1% de 2-mercaptoetanol. Seguido de esto, se añadieron 300 μ L de isopropanol por muestra y se homogeneizó. Simultáneamente, se activaron las columnas, colocándoles 100 μ L del amortiguador de activación, se centrifugó a 10 000 x g por 30 s y se desechó el amortiguador eluído. Después, se colocaron las muestras y se centrifugaron a 10000 x g por 30 s, desechando el filtrado.

Seguidamente, se lavaron las columnas dos veces con 700 μ L de amortiguador de lavado y se centrifugó a 10 000 x g por 30 s, desechando el eluído. Inmediatamente, las columnas se secaron, centrifugando a 10000 x g por 2 min.

Para eluir al RNA de las columnas, estas se colocaron en un tubo Eppendorf nuevo y se añadieron 30 μ L de agua libre de RNAsas. Se incubó por 1 min y se eluyó, centrifugando a 10 000 x g por 1 min.

Para establecer la concentración y pureza del RNA total, se utilizaron 1.5 μ L de la muestra y se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Multiskan GO) a 260 y 280 nm.

Como actividad académica extracurricular, se realizó un video en el que se muestra el procedimiento de esta técnica. Este se puede consultar a través de: <https://youtu.be/shekLR9SA2c>.

6.4. Transcripción reversa

A partir de las muestras de RNA total, se realizó la reacción de transcripción reversa, ocupando el estuche de síntesis de cDNA (Jena Bioscience PCR-511S). El procedimiento se realizó como lo indica el fabricante, utilizando oligo-dT15-25 como cebador y 1000 ng de RNA total por reacción.

Las reacciones se incubaron en un termociclador (Axygen Maxygene II, PCR convencional) con las siguientes condiciones: 10 min a 42°C, seguido de 60 min a 50°C y 10 min a 70°C.

Como actividad académica extracurricular, se realizó un video en el que se muestra el procedimiento de esta técnica. Este se puede consultar en el vínculo de la sección 5.3

6.5. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Mediante sondas Taqman® y con el cDNA sintetizado, se analizó la expresión de los siguientes genes: *ETV5* (Rn00465814_g1), *E2F1* (Rn01536222_m1), *p27^{KIP1}* (Rn00582195_m1) y *L32* (Rn00820748_g1).

Para las reacciones de qPCR, se utilizó una mezcla maestra (Jena Bioscience, PCR-365L) y 1 μ L del cDNA para cada uno de los genes, haciendo las reacciones por triplicado. Los parámetros de incubación en el termociclador (Agilent AriaMX, PCR en

tiempo real) fueron: 2 min a 50°C, 2 min a 95°C, posteriormente 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. Procedimiento descrito en la Figura 6

Los datos obtenidos se procesaron por el método $\Delta\Delta C_t$, obteniendo valores de expresión relativa, normalizados por el gen de referencia *L32*.

Como actividad académica extracurricular, se realizó un video en el que se muestra el procedimiento de esta técnica. Este se puede consultar en el vínculo de la sección 5.3

6.6. Extracción y cuantificación de proteínas

Para la extracción de proteínas totales, se colectaron las células transfectadas y se les añadieron 250 μ L de una mezcla de amortiguador de ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA, Thermo Scientific 89900) con inhibidor de proteasas al 1% (Thermo Scientific 78410), inhibidor de fosfatasa al 1% (Thermo Scientific 1862495) y benzonasa al 0.1% (Sigma E1014-25KU).

Las proteínas de los extractos se cuantificaron con un estuche (Biorad 500-0116) que emplea un ensayo colorimétrico tipo Lowry. En este ensayo, primero ocurre una reacción de la proteína con tartrato de cobre en medio alcalino, seguido de esto, el reactivo de Folin se reduce por las proteínas tratadas con cobre, lo que produce un color azul característico (Lowry, et al. 1951).

Los reactivos fueron preparados como lo indica el fabricante y las muestras se cuantificaron en una dilución 1:3. Las reacciones se leyeron en un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Multiskan GO) a 750 nm y las concentraciones se calcularon interpolando en una curva patrón de albúmina.

Como actividad académica extracurricular, se realizaron dos videos en los que se muestra el procedimiento de estas técnicas. Estos se pueden consultar a través de:

<https://youtu.be/WeCXuuleWIA> y <https://youtu.be/caFt1JBZBq8>.

6.7. Western blot

Se realizaron geles de poliacrilamida al 14% (Anexo 10.1 y 10.2), cargando 75 µg de proteína por pozo. La electroforesis se hizo a 80 V por 30 min y después a 120 V por 6 h (Anexo 10.3 y 10.4). Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF), por medio de un sistema de transferencia semiseca, (Bio-rad, Trans-Blot® Turbo™, Anexo 10.5) durante 20 minutos a 25 V y 1.0 A. Al finalizar la transferencia, el gel de poliacrilamida se tiñó con azul de Coomassie y la membrana PVDF con rojo de Ponceau para evidenciar la correcta transferencia de proteínas.

Para bloquear las membranas, se utilizó una mezcla de leche al 5% y TWEEN al 1.2% en PBS 1x (Anexo 10.6 y 10.7) por 1 h. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Para realizar esto, se utilizaron las siguientes diluciones: *ETV5* (Santa Cruz Biotechnology sc-100941) dilución 1:200, p27^{KIP1} (Aviva Systems Biology OALA04950) dilución 1:400 y β-actina (Cell Signaling 4967S) dilución 1:5000.

Seguido de la incubación, se realizaron 3 lavados con PBS 1x por 10 minutos y se colocó anticuerpo secundario unido a peroxidasa de rábano. Para *ETV5* y p27^{KIP1} se utilizó anti-IgG de ratón (Cell Signaling 7076P2) dilución 1:5000; para β-actina se utilizó anti-IgG de conejo (Cell Signaling 7074P2) dilución 1:5000, incubando por 1 h a temperatura ambiente.

Por último, las membranas se lavaron tres veces con PBS 1x por 10 minutos y se agregó el reactivo de revelado para quimioluminiscencia (Millipore WBKLS0100). Se incubaron por 2 minutos a temperatura ambiente y se capturó la imagen con ayuda de un fotodocumentador (VILBER Fusion Fx). La densitometría de las imágenes fue procesada a través del software ImageJ v1. 52o. Procedimiento descrito en la Figura 6

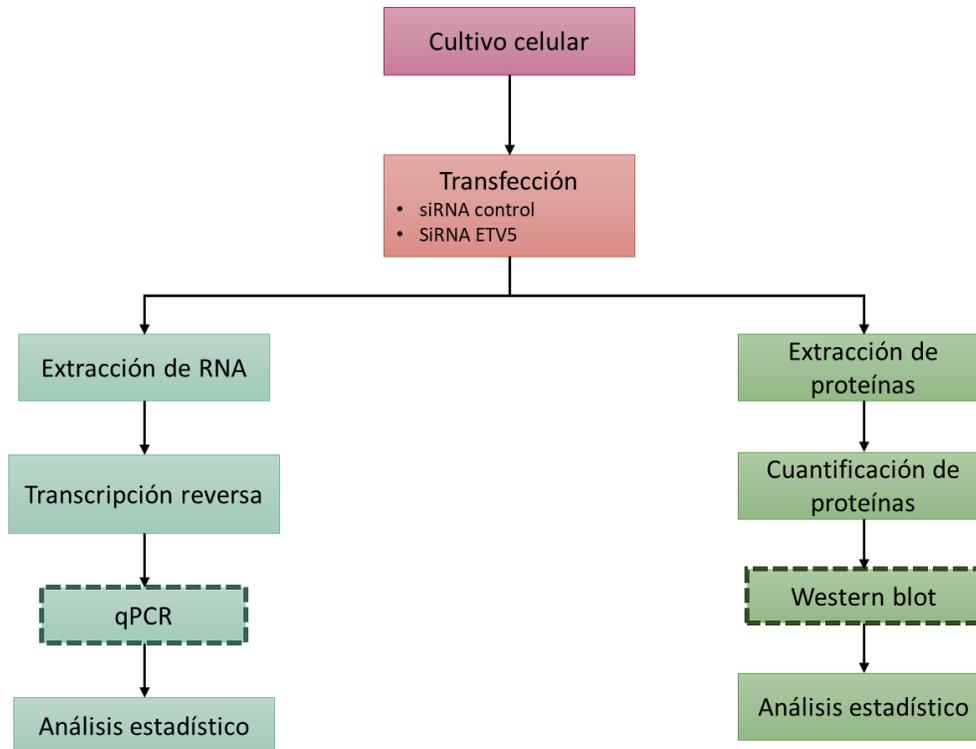


Figura 6. Procedimiento de la estrategia experimental para realizar los ensayos de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) y Western blot.

6.8. Análisis *in silico* de las regiones promotoras de *E2F1* y *p27^{KIP1}*

Las regiones promotoras de los genes *E2F1* y *p27^{KIP1}* fueron descargadas de los buscadores de NCBI-gene (National Center for Biotechnology Information), UCSC (University of California Santa Cruz) y Ensembl Project. Posteriormente, se realizó el alineamiento entre las secuencias descargadas para confirmar y verificar la identidad de las secuencias.

Para ubicar los posibles sitios de unión de *ETV5*, las regiones promotoras de los genes *E2F1* y *p27^{KIP1}*, fueron evaluadas en las siguientes plataformas: JASPAR, Match 1.0 y PROMO. Se ubicaron los sitios de unión, utilizando las matrices predefinidas de los motivos de unión de ETS. Finalmente, los sitios que se predijeron fueron comparados entre sí, y sólo se consideraron aquellos que coincidieron entre las plataformas utilizadas.

6.9. Diseño de oligonucleótidos para amplificar las regiones promotoras de *E2F1* y *p27^{KIP1}*

Para poder clonar cada uno de los fragmentos de los promotores de *E2F1* y *p27^{KIP1}*, se diseñaron oligonucleótidos que flanquean a los segmentos descritos en la Figura 11. Seguido de esto, se realizaron ensayos de PCR, amplificando estas secuencias a partir de DNA genómico de las células INS-1 (832/13).

A estos oligonucleótidos se les añadió la secuencia de la enzima de restricción, con el fin de crear sitios de restricción para la subclonación en el vector pGL3. Como consideraciones, se tomó en cuenta que las enzimas de restricción utilizadas para los oligonucleótidos no tuvieran sitios de corte en las regiones amplificadas del promotor de interés y, además, que estas enzimas estuvieran en el sitio de clonación múltiple de pGL3. En el caso de las secuencias del promotor de *E2F1*, la construcción de los oligonucleótidos se realizó con la secuencia de corte para MluI en los oligonucleótidos de sentido *forward* y con la secuencia de corte para XhoI en los oligonucleótidos de sentido *reverse*. Por otro lado, las secuencias del promotor de *p27^{KIP1}*, se construyeron con la secuencia de corte para KpnI en los oligonucleótidos de sentido *forward* y con la secuencia de corte para MluI en los oligonucleótidos de sentido *reverse* (Tabla 1).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los segmentos de las regiones promotoras de *E2F1* y *p27^{KIP1}*.

Gen	Región amplificada	Tamaño del fragmento	Oligonucleótidos*
<i>E2F1</i>	ABC (-2169 a -66)	2116 pb	5'-ACGCGTTCGGCTCCACTCCACATTTTC-3'
			5'-CTCGAGGGTAGCAGACATTGGTTGCAG-3'
	BC (-1280 a -66)	1227 pb	5'-ACGCGTGCCTACTGGACTTGGGGAC-3'
			5'-CTCGAGGGTAGCAGACATTGGTTGCAG-3'
	C (-701 a -66)	648 pb	5'-ACGCGTTGAACTTGGAAAATCCGCCCG-3'
			5'-CTCGAGGGTAGCAGACATTGGTTGCAG-3'
	B (-1280 a -681)	612 pb	5'-ACGCGTGCCTACTGGACTTGGGGAC-3'
			5'-CTCGAGCGGGCGGATTTTCCAAGTTCA-3'
	A (-2169 a -1281)	901 pb	5'-ACGCGTTCGGCTCCACTCCACATTTTC-3'
			5'-CTCGAGTACAAGGAGCTCTCAAGCCCG-3'
<i>p27^{KIP1}</i>	ABC (-2000 a -24)	1989 pb	5'-GGTACCTCTGTATTTTCATCTGCACACC-3'
			5'-ACGCGTAACACCCCGAAAGCACGAGCC-3'
	BC (-1220 a -24)	1209 pb	5'-GGTACCCAAATCTAGTCTTGGACCCTT-3'
			5'-ACGCGTAACACCCCGAAAGCACGAGCC-3'
	C (-501 a -24)	489 pb	5'-GGTACCTCGCGGGCAAAGACCTGGAGG-3'
			5'-ACGCGTAACACCCCGAAAGCACGAGCC-3'
	B (-1220 a -502)	731 pb	5'-GGTACCCAAATCTAGTCTTGGACCCTT-3'
			5'-ACGCGTAACCCAGGGCCTGGGCCAGTG-3'
	A (-2000 a -1221)	792 pb	5'-GGTACCTCTGTATTTTCATCTGCACACC-3'
			5'-ACGCGTCAAGTGATTTATAATACTACC-3'

*Secuencias de enzimas de restricción, XhoI: CTCGAG, MluI: ACGCGT, KpnI: GGTACC

6.10. Extracción de DNA genómico de las células INS-1 (832/13)

Para realizar la amplificación de las regiones promotoras, se utilizó DNA genómico de las células INS-1 (832/13). Se extrajo y purificó DNA a partir de estas células, utilizando un estuche (Zymo Research, D4069), el cual permite el aislamiento de DNA a través de columnas de sílice.

A partir de un botón de células INS-1 (832/13), se agregó el amortiguador de lisis junto con 20 µL de proteinasa K. Se mezcló con ayuda del vórtex y se incubó a 55°C por 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se agregó a la muestra digerida, 1 volumen de amortiguador de unión de DNA y se mezcló. A continuación, la muestra se transfirió a una columna y se centrifugó a 12 000 x g por 1 minuto. Se desechó la solución eluída y

se lavó la columna 3 veces: primero con 400 µL de amortiguador de prelavado, seguido de un lavado con 700 µL de amortiguador de lavado y luego, con 200 µL de amortiguador de lavado. Posteriormente, la columna se colocó en un tubo nuevo y el DNA fue eluido con 50 µL de agua libre de DNAsas, centrifugando a 12 000 x g por 1 minuto.

6.11. Reacción en cadena de la polimerasa punto final (PCR)

Para realizar la amplificación de las regiones promotoras, se utilizó una polimerasa de alta fidelidad que coloca terminaciones de adenina en la región 3' (Jena Bioscience, PCR-204S). Esta adenina permite que las secuencias amplificadas, se puedan insertar en el sistema de clonación pGEM, el cual contiene residuos de timina en su extremo 3'. Los oligonucleótidos utilizados para estas reacciones se describen en la tabla 1.

Las condiciones para la PCR fueron: 1 ciclo desnaturalización a 95 °C 2 min; 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C 20 segundos, alineamiento de 50 – 68 °C, de acuerdo con las temperaturas optimizadas (Tabla 2) por 30 segundos, elongación de 68°C por 1 min/kb y un último ciclo de extensión a 68°C por 1 min/kb.

6.12. Purificación de DNA en gel de agarosa

Para realizar la purificación de las secuencias amplificadas, los productos de PCR se mezclaron con amortiguador de carga de DNA (Anexo 10.8) y fueron cargados en un gel de agarosa al 1% (Anexo 10.9).

Posteriormente, las bandas correspondientes a los fragmentos amplificados fueron cortadas del gel. Los segmentos del gel se deshidrataron centrifugándolos a través de una gasa a 3 000 x g. A la solución eluida se le añadió 1 volumen de una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción de 25:24:1. Se mezcló durante 1 minuto con ayuda del vórtex. Las muestras se centrifugaron por 15 000 x g por 5 min, a temperatura ambiente. Se retiró la fase acuosa (parte superior) y se mezcló con un tercio de volumen de acetato de amonio 10 M. Después, se mezcló con 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C y se incubó durante toda la noche a -20 °C. A continuación, se centrifugó a 15 000 x g por 30 min a 4°C y se decantó la muestra. El botón de DNA fue

lavado con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 15 000 x g por 5 minutos a 4°C. La muestra se volvió a decantar. El botón se secó a 50 °C por 5 minutos y se resuspendió en 10 µL de agua libre de DNAsas.

Finalmente, la concentración y pureza fue determinada con ayuda de un espectrofotómetro (Thermo Scientific, Multiskan GO), realizando lecturas a 260 y 280 nm.

Como actividad académica extracurricular, se realizó un video en el que se muestra el procedimiento de esta técnica. Este se puede consultar a través de: <https://youtu.be/sveDsunhq6k>.

6.13. Clonación en el vector pGEM-T Easy

Se utilizó el vector pGEM-T Easy (Promega, A1360) para clonar las regiones promotoras de *E2F1* y *p27^{KIP1}*, divididas en 5 fragmentos (Figura 7). Para la ligación se siguió las instrucciones del fabricante.

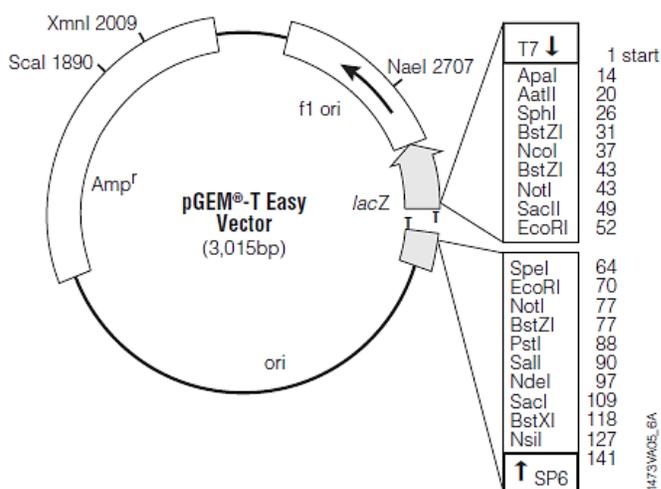


Figura 7. Vector pGEM-T Easy.

Este plásmido tiene extremos de timina que permiten la clonación de los amplicones de DNA que contienen terminaciones de adenina.

En un tubo Eppendorf de 500 µL, se colocaron 5 µL del amortiguador de ligación, 50 ng del vector pGEM-T Easy, un volumen suficiente de inserto en relación molar 3:1 del inserto: vector, 1 µL de ligasa T4 y agua suficiente para un volumen final de 10 µL. La reacción anterior se dejó incubando toda la noche a 4 °C y posteriormente, se realizó la

transformación de bacterias de la cepa *E. coli* XL10-Gold con 5 µL de la reacción anterior. Finalmente, se corroboró por PCR las colonias que adquirieron el plásmido y después, se purificaron los plásmidos.

Como actividad académica extracurricular, se realizó un video en el que se muestra el procedimiento de esta técnica. Este se puede consultar a través de: <https://youtu.be/II5qmeHlj6Q>.

6.14. Elaboración de células competentes *E. coli* XL10-Gold

Para hacer las células competentes, primero, se aisló una colonia de la cepa *E. coli* XL10-Gold en una placa con agar LB (SIGMA-ALDRICH, L3027-250G). Después, se tomó una colonia y se dejó crecer en 10 mL de caldo LB a 37°C en agitación a 250 rpm, durante toda la noche. Luego, se transfirieron 2 mL de cultivo a 200 mL de caldo LB (SIGMA-ALDRICH, L3022-250G) y se incubó a 37°C a 250 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.375 realizando la lectura a 590 nm.

El cultivo se transfirió a 4 tubos Falcon de 50 mL y se mantuvieron a 4°C por 10 minutos. Seguido de esto, se centrifugaron a 3000 x g por 7 minutos a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y los botones celulares se resuspendieron en 10 mL de una solución a 4°C de CaCl₂ 100 mM (Anexo 10.10). A continuación, se centrifugó a 3000 x g por 5 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante y los botones celulares se resuspendieron en 10 mL de solución de CaCl₂ 100 mM, por 30 minutos en hielo. Se centrifugó a 3000 x g por 7 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante y los botones celulares se juntaron y resuspendieron en un volumen final de 2.5 mL de solución de CaCl₂ 60 mM (Anexo 10.11). Finalmente, se almacenaron alícuotas de 100 µL en tubos Eppendorf de 1.5 mL, a -80 °C.

6.15. Ensayos de transformación

Para amplificar los vectores clonados con las secuencias de interés, se utilizó la cepa ultracompetente *E. coli* XL10-Gold. Las bacterias competentes, se incubaron con al menos 25 ng de plásmido por 30 minutos. Posteriormente, se realizó un choque térmico a 42 °C por 40 segundos y se incubó en hielo por 2 minutos. Después, se agregaron

900 μ L de medio SOC (Anexo 10.12 y 10.13) y se incubaron por 90 minutos a 37 °C, en agitación a 250 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 1000 x g por 3 minutos, se retiraron 830 μ L del sobrenadante y se resuspendieron las células en el volumen restante. Finalmente, las bacterias se sembraron en una caja con agar LB (Anexo 10.14) y ampicilina (100 μ g/mL), y se incubaron a 37°C, por toda la noche.

6.16. Purificación de plásmidos

Se realizaron cultivos de las bacterias transformadas con los plásmidos de interés en caldo LB (Anexo 10.15). Utilizando ampicilina 100 μ g/mL (GOLGBIO, A301-5) e incubando por 16 h, a 37 °C, en agitación a 250 rpm. Para la purificación de los plásmidos, se utilizó un estuche (Jena Bioscience, PP-204S), el cual utiliza el método de lisis alcalina y la implementación de columnas de sílice, para la recuperación de los vectores.

La preparación de las muestras se siguió como lo indica el fabricante, centrifugando las células a 1000 x g por 5 minutos, seguido se decantó el sobrenadante y el botón de células se resuspendió en 300 μ L de amortiguador de lisis. Se mezcló con ayuda del vórtex por 1 minuto y se añadió 300 μ L de amortiguador neutralizante, mezclando por inversión 4 veces. Mientras tanto, se activaron las columnas de sílice con 100 μ L de amortiguador de activación y se centrifugó a 10 000 x g por 30 segundos. Posteriormente, las muestras se transfirieron a las columnas y se centrifugó a 10 000 x g por 30 segundos. Las columnas se lavaron dos veces con amortiguador de lavado, el primer lavado con 500 μ L y el segundo con 700 μ L centrifugando a 10 000 x g por 30 segundos, entre cada uno. Después, las columnas se secaron centrifugando por 2 minutos a 10 000 x g, se colocaron en un tubo limpio. Los plásmidos se eluyeron con 35 μ L de agua libre de DNAsas, incubando por 1 minuto a temperatura ambiente y centrifugando a 10 000 x g por 1 minuto.

Como actividad académica extracurricular, se realizó un video en el que se muestra el procedimiento de esta técnica. Este se puede consultar a través de: <https://youtu.be/F4C6M1ZWGfl>.

6.17. Digestión de DNA con enzimas de restricción

Los fragmentos clonados en pGEM-T Easy fueron digeridos utilizando las enzimas de restricción con las cuales fueron diseñados los oligonucleótidos. Para los fragmentos de la región promotora de E2F1 se utilizaron las enzimas XhoI (Thermo Scientific, ER0691) y MluI (Jena Bioscience, EN-E2287-01). Y para los segmentos de la región promotora de *p27^{KIP1}*, se utilizaron las enzimas KpnI (Jena Bioscience, EN-119S) y MluI (Jena Bioscience, EN-E2287-01). Para realizar estas reacciones, se siguieron las indicaciones del fabricante.

En un tubo de 500 µL, se mezclaron 5 µL de amortiguador universal 10x, 1.5 µg de DNA, 10 unidades de MluI, 5 unidades de KpnI o 10 unidades de XhoI y agua suficiente para un volumen final de 50 µL. Posteriormente, las reacciones se incubaron a 37 °C por 3 h.

6.18. Subclonación en vector pGL3

Para subclonar las regiones promotoras en el vector de expresión de luciferasa, pGL3, se realizó el ensayo de restricción de los fragmentos clonados en pGEM-T Easy, así como del vector pGL3. Posteriormente, se purificó cada uno de ellos por gel de agarosa.

Los fragmentos purificados se ligaron con la enzima ligasa T4 (BioLabs, M0370S), como lo indica el fabricante. Se colocaron 20 ng del vector pGL3, un volumen de inserto en una proporción molar de 3 veces más que el vector, 5 µL del buffer con la ligasa y agua suficiente para un volumen final de 10 µL. La reacción se dejó incubar toda la noche a 4 °C. Después se transformó en la cepa competente de *E. coli* XL10-Gold y posteriormente, se analizaron las colonias por PCR, para corroborar las colonias que adquirieron el plásmido.

6.19. Mutagénesis dirigida

Para este ensayo, se utilizó un estuche de mutagénesis dirigida (Agilent, 200524). Se sintetizaron oligonucleótidos de acuerdo con las mutaciones deseadas de entre 25 y 45 pares de bases y con una temperatura de fusión mayor a 78 °C. Para realizar estas reacciones, se utilizaron 5 µL del buffer de reacción 10x, 100 ng de DNA, 125 ng de

cada oligonucleótido, 1 μL de dNTP's, 125 U de la DNA polimerasa Pfu Ultra y agua suficiente para completar un volumen de 50 μL .

Las condiciones del perfil térmico fueron: 1 ciclo de 95°C por 30 segundos y 18 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 68 °C 1 minuto y 68 °C 1 min por kilobase.

6.20. Ensayo de expresión de luciferasa

Se realizó el cultivo de las células INS-1 (832/13) en placas de 12 pozos, colocando una cantidad de 3×10^6 células por pozo. A las 24 h de cultivo, las células se transfectaron siguiendo el protocolo de transfección con 20 nM de siC o siE, 20 ng de vector pRL, 500 ng del vector pGL3 de las construcciones del promotor de *p27^{KIP1}* o 750ng del vector pGL3 de las construcciones del promotor de *E2F1*, junto con 0.5 μL de agente de transfección. Al cabo de las 72 h post-transfección, las células fueron lisadas y recolectadas en 250 μL de buffer de lisis.

El ensayo de luciferasa fue montado con el estuche de luciferasa dual (Promega, E1910), el cual contiene en el Reactivo 1 D-Luciferina, sustrato de la luciferasa de luciérnaga y en el Reactivo 2 coelenterazina, sustrato de la luciferasa renilla.

Para medir la luminiscencia, se utilizó un luminómetro (Promega, GloMaxE6070). En un tubo Eppendorf de 1.5 mL se colocaron 50 μL del Reactivo 1, con 10 μL del lisado celular. La muestra fue homogeneizada y colocada en el luminómetro para su lectura. Posteriormente, se añadieron 50 μL del Reactivo 2, se homogeneizó la muestra y se colocó en el luminómetro para su lectura. Los resultados de luminiscencia de luciferasa de luciérnaga se normalizaron respecto a la luminiscencia de luciferasa renilla y a la cantidad total de proteína. Procedimiento descrito en la Figura 8.

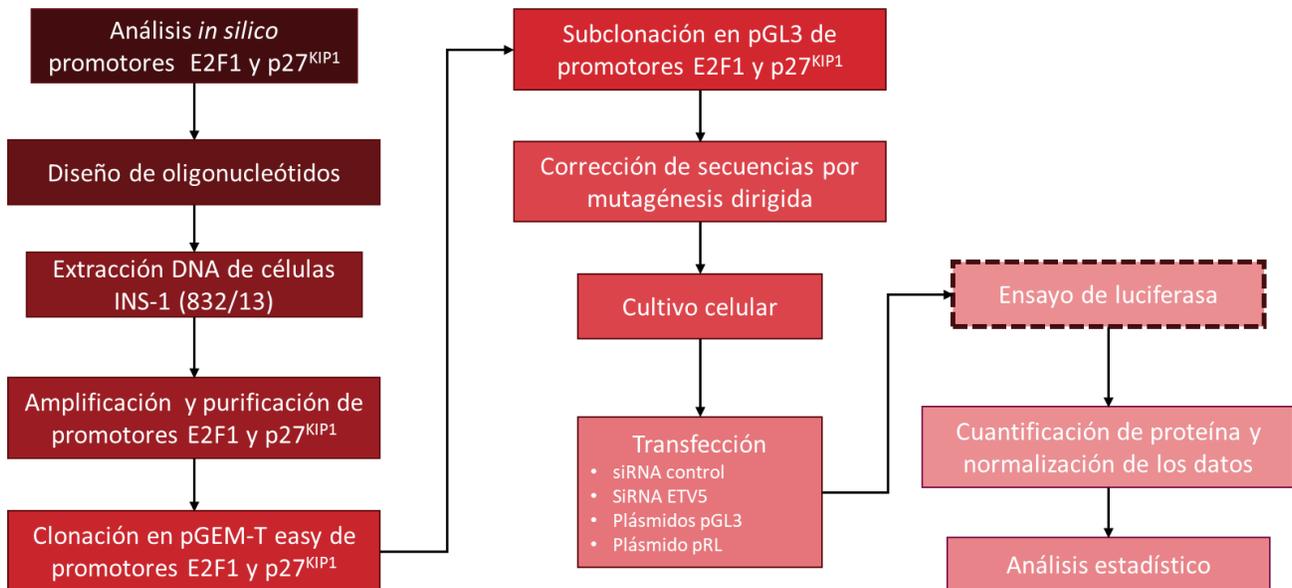


Figura 8. Procedimiento de la estrategia experimental para realizar los ensayos de expresión de luciferasa.

6.21. Tinción de actina con faloidina

Las células INS-1 (832/13) fueron cultivadas y transfectadas sobre cubreobjetos de 22x22 mm, recubiertos con poli L-lisina. Posteriormente, se lavaron dos veces con 500 μ L de PBS 1x y se fijaron con formaldehído al 3.7%, por 10 minutos, a temperatura ambiente. Se volvieron a lavar dos veces con 500 μ L de PBS 1x y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.1% en PBS 1x por 5 minutos. Se lavaron nuevamente por duplicado con 500 μ L PBS 1x y se incubaron con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% por 30 minutos. Posteriormente, los cubreobjetos se incubaron con 200 μ L de una solución de faloidina unida a Alexa Flúor 488 (Thermo Fisher Scientific; A12379) con 5 unidades/mL por 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

Para el montaje de las muestras, los cubreobjetos se enjuagaron 2 veces con 500 μ L de PBS 1x y se colocaron sobre un cubreobjetos con 25 μ L de medio de montaje con DAPI (Abcam ab104139), el cual es un colorante de unión al núcleo, que permite visualizar la cantidad de células presentes en la muestra. Finalmente, las muestras se observaron en el microscopio de fluorescencia a un aumento de 40 X. Procedimiento descrito en la Figura 9

6.22. Inmunofluorescencia de marcadores de MET

Las células INS-1 (832/13) fueron cultivadas y transfectadas sobre cubreobjetos de 22x22 mm. Se lavaron dos veces con 500 μ L de PBS 1x y se fijaron con paraformaldehído al 4% por 30 minutos, a temperatura ambiente. Se volvieron a lavar dos veces con 500 μ L de PBS 1x y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.2% en PBS 1x, por 30 minutos. Se lavaron nuevamente por duplicado con 500 μ L PBS 1x y se incubaron con PBS 1x-BSA al 2%, por 1 hora. Seguido de esto, se retiró la solución y se dejó secar la laminilla. Posteriormente, se delimitó el área donde se colocó el anticuerpo con un plumón hidrofóbico. Se agregaron 200 μ L del anticuerpo primario diluido en una solución de PBS 1x-BSA al 2% durante una hora. Las diluciones de los anticuerpos utilizadas para las tinciones fueron: para E-cadherina 1:100 (Santa Cruz, SC-8426) y para vimentina 1:250 (Santa Cruz, SC-32322). Las muestras se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

Posteriormente, se dejaron a temperatura ambiente por 3 horas y se realizaron 3 lavados con 500 μ L de PBS 1x. Después, se incubó con 200 μ L de anticuerpo secundario diluido 1:200 en PBS 1x-BSA al 2% durante 1 h a temperatura ambiente, dentro de una cámara húmeda y en oscuridad. Para ambas tinciones, se utilizó un anticuerpo secundario IgG anti-ratón unido a rojo Texas (Santa Cruz, SC-2781).

Cuando terminó la última incubación, se lavaron las muestras 3 veces con 500 μ L de PBS 1x y las muestras se colocaron en un portaobjetos en medio de montaje con DAPI (Abcam ab104139). Finalmente, las muestras se observaron en el microscopio de fluorescencia a un aumento de 40 X. Procedimiento descrito en la Figura 9

6.23. Ensayo de herida

Las células INS-1 (832/13) se cultivaron en placas de 6 pozos. Después de 24 h de cultivo, se realizó un rasguño en el fondo del pozo; seguido de esto, se realizó la transfección de las células. Para inhibir la proliferación de las células, se añadió colchicina a una concentración de 0.01 μ M. Posteriormente, se capturaron imágenes del cultivo sobre un campo representativo del rasguño, a un aumento de 10x, cada 24 h hasta las 72h post-transfección. Procedimiento descrito en la Figura 9

6.24. Microscopía electrónica de transmisión

Para poder observar la ultraestructura de las células INS-1 (832/13) en presencia o ausencia de *ETV5*, se realizó el ensayo de transfección como previamente fue descrito. A las 72 horas post-transfección, las células se desprendieron de la caja, se recolectaron en un botón celular y se fijaron con 500 μ L fijador de Karnovsky modificado (Anexo 10.16).

Posteriormente, las células se lavaron con PBS 1x 3 veces por 5 minutos. Se realizó una post-fijación con acetato de uranilo (contrastante de membranas) y tetraóxido de osmio (contrastante de ácidos nucleicos), en una proporción 1:1. Se realizaron 3 lavados con PBS 1x por 5 minutos. Después, se deshidrataron las muestras incubando con soluciones crecientes de etanol, desde 50% hasta 95%, por 10 minutos y finalmente con etanol absoluto 2 veces, por 15 minutos. Luego, se incubó con óxido de propileno 2 veces, por 15 minutos.

Se realizó la preinclusión de las muestras, utilizando una mezcla de resina con óxido de propileno en proporción 1:1 y se incubaron por 2 horas. Una segunda preinclusión se hizo repitiendo el proceso. En la tercera preinclusión, la resina se colocó en una proporción 1:2 con el óxido de propileno. Por último, se retiró la resina, se recuperaron los botones celulares y se polimerizaron con resina a 60°C toda la noche.

Las muestras se observaron en el microscopio electrónico de transmisión. Este equipo permite visualizar las muestras a través de cortes ultrafinos, utilizando un haz de electrones que se dirigen a la muestra. Parte de los electrones son absorbidos gracias a las soluciones de contraste, mientras que otros atraviesan la muestra, lo cual permite al equipo realizar una imagen aumentada (Tizro, Choi, y Khanlou 2019). Los bloques de resina que contienen las células fueron cortados de 300 a 500 nm para teñirlos con azul de toluidina y ver la integridad de las muestras. Seguido de esto, se realizó un corte ultrafino (60 a 90 nm) y se montaron en rejillas de cobre de 200 mesh. Las preparaciones se observaron a escalas de 2 μ m, 1 μ m, 0.5 μ m y 0.2 μ m. Procedimiento descrito en la Figura 9.

6.25. Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los datos, se utilizaron las pruebas paramétricas, T-student y ANOVA de una vía. En los casos donde se compararon dos grupos, se utilizó la prueba T-student con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Por otro lado, al comparar más de 3 grupos, se utilizó la prueba ANOVA de una vía, con un nivel de significancia de $p < 0.05$, realizado la comparación múltiple mediante la prueba post-hoc Tukey.

Los gráficos como los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software GraphPad Prism versión 8.0.2. En cada gráfico los resultados son mostrados como el promedio de los resultados \pm el error estándar de la media (SEM).

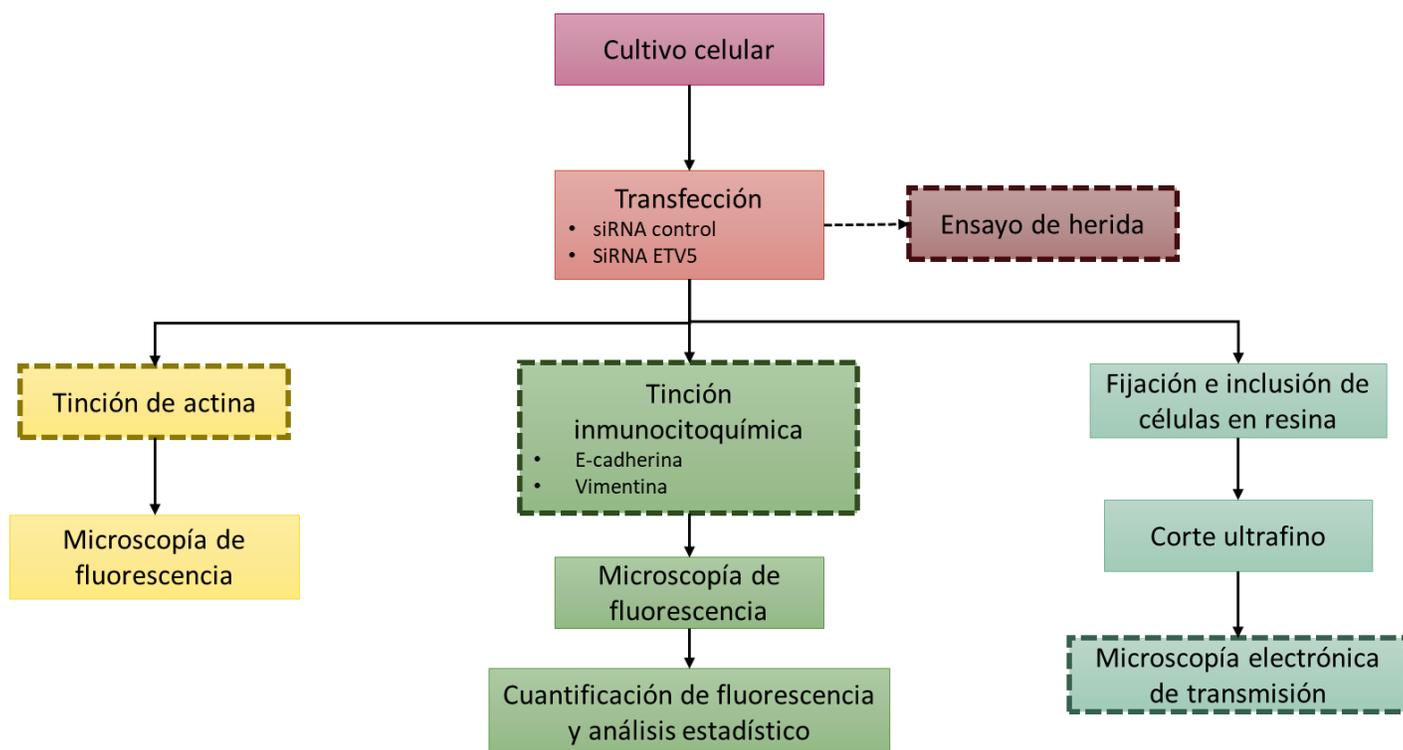


Figura 9. Procedimiento de la estrategia experimental para realizar los ensayos de herida, tinción de actina, tinciones inmunocitoquímicas y microscopía electrónica de transmisión.

7. Resultados

7.1. Niveles de expresión de $p27^{KIP1}$ en ausencia parcial de *ETV5*

Anteriormente, nuestro grupo observó que al silenciar parcialmente a *ETV5* (en un 50%), en la línea celular INS-1 (832/13), se sobreexpresó *E2F1*. Por otra parte, se había descrito que *E2F1* puede regular la expresión del gen $p27^{KIP}$, el cual es un inhibidor del ciclo celular (Duan et al. 2017; Luo et al. 2017; Wang et al. 2005). Es por esto, que se decidió estudiar la expresión de $p27^{KIP}$, en nuestro modelo de estudio.

Cuando se silenció parcialmente a *ETV5* (Figura 10A y 10C), se encontró que $p27^{KIP1}$ se sobreexpresó en un 42% a nivel de transcrito (Figura 10A), y que aumentó en un 28% a nivel de proteína (Figura 10B y Figura 10C). Esto sugiere que *ETV5* podría estar actuando como un represor de la transcripción, ya que la expresión de *E2F1* y $p27^{KIP1}$ aumenta en ausencia de *ETV5*.

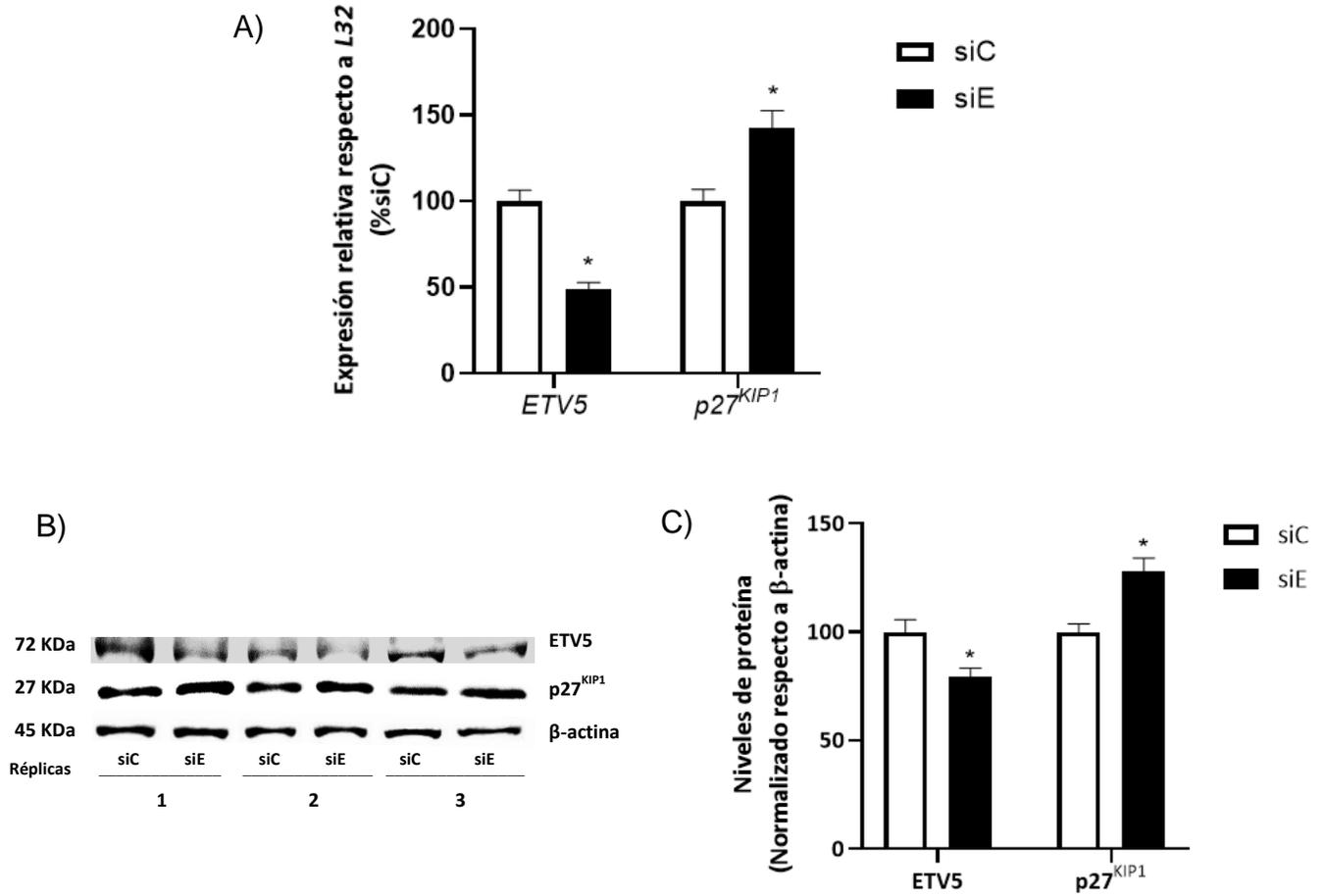


Figura 10. Expresión de $p27^{KIP1}$ a nivel de transcrito y proteína después de 72 horas del silenciamiento parcial de *ETV5*, en la línea celular INS-1 (832/13). A) Expresión relativa de *ETV5* y *p27^{KIP1}* después del ensayo de transfección con el siRNA control (siC) y siRNA contra *ETV5* (siE). B) Western blot de *ETV5* y *p27^{KIP1}* después del ensayo de transfección con siC y siE, se muestran los pesos moleculares esperados de cada una de las proteínas de acuerdo con el anticuerpo utilizado. C) Cuantificación de los niveles de proteína de *ETV5* y *p27^{KIP1}* después de 72 h de transfección con siC y siE. Prueba estadística T-Student, n= 3, *p<0.05, todos los resultados son presentados como el promedio \pm SEM.

7.2. Análisis *in silico* de los sitios de unión de ETV5 a los promotores de E2F1 y p27^{KIP1}

Sabiendo que al silenciar parcialmente a ETV5 en la línea celular INS-1 (832/13), se aumentaron los niveles de expresión de E2F1 y p27^{KIP1}, se decidió comprobar si ETV5 es capaz de regular la transcripción de estos genes, uniéndose directamente a sus secuencias promotoras.

Primero, se estudió si las regiones promotoras de E2F1 y p27^{KIP1} poseen sitios de unión a ETV5, para lo cual se realizó el análisis *in silico*. Se estudió la región promotora, 2000 pares de bases río arriba del inicio de la transcripción, de cada uno de estos genes. Las secuencias de los promotores se obtuvieron de las bases de datos de NCBI-gene (National Center for Biotechnology Information), UCSC (University of California Santa Cruz) y Ensembl Project.

Para predecir los posibles sitios de unión de ETV5, se utilizaron las siguientes plataformas de uso libre: JASPAR, Match 1.0 y PROMO.

En el caso del promotor de E2F1, se encontraron 7 posibles sitios de unión de ETV5, los cuales se ubicaron a nivel de -1822, -1696, -1642, 1066, -585, -471 y -450 pares de bases del promotor (Figura 11A). Por otro lado, para el promotor de p27^{KIP1}, se ubicaron 5 posibles sitios de unión de ETV5, ubicados a nivel de -1703, -1480, -1080, 1036 y -425 pares de bases del promotor (Figura 11B).

De acuerdo con la ubicación de los posibles sitios de unión de ETV5, las regiones promotoras se dividieron en tres secciones de aproximadamente 650 pares de bases cada una: sección A, sección B y sección C (Figura 11A y 11B). Por lo tanto, se elaboraron cinco construcciones de las regiones promotoras, nombrándolas como: fragmento ABC (región promotora completa), fragmento BC (primera y segunda sección de la región promotora), fragmento C (primera sección de la región promotora), fragmento B (sección intermedia de la región promotora) y fragmento A (última sección distal de la región promotora). Lo anterior se planeó con la finalidad de poder evaluar la región donde ETV5 se une directamente a los promotores de estos genes y regula transcripcionalmente a estos.

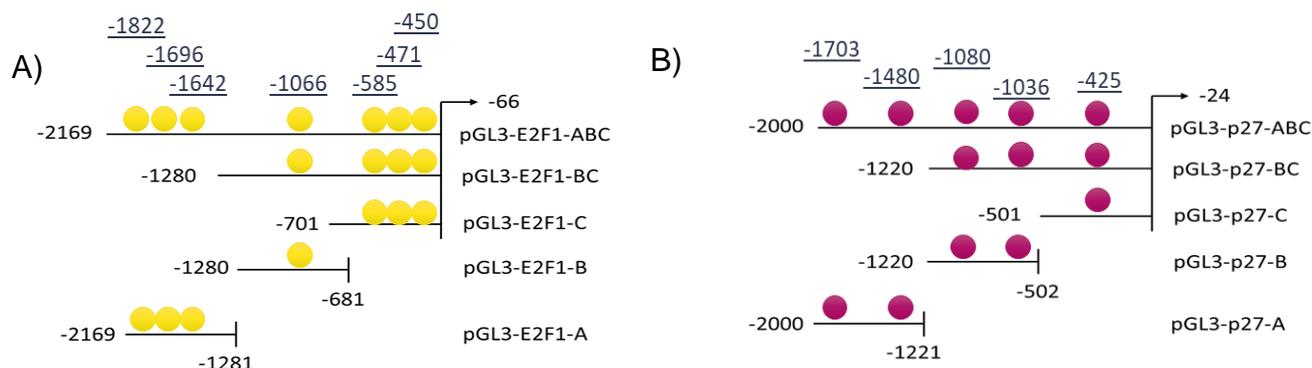


Figura 11. Diseño de las regiones promotoras evaluadas de *E2F1* y *p27^{KIP1}* y sus posibles sitios de unión de *ETV5* mediante un análisis *in silico*. A) Predicción de los sitios de unión de *ETV5* a la región promotora de *E2F1*. Para su estudio fue dividida en 5 diferentes segmentos: ABC: de -2169 a -66 pb, BC: de -1280 a -66 pb, C: de -701 a -66 pb, B: de -1280 a -681 y A: de -2169 a -1281. B) Predicción de los sitios de unión de *ETV5* a la región promotora de *p27^{KIP1}*. Para su estudio fue dividida en 5 diferentes segmentos: ABC: de -2000 a -24 pb, BC: de -1220 a -24 pb, C: de -501 a -24 pb, B: de -1220 a -502 y A: de -2000 a -1221.

7.3. Amplificación de las regiones promotoras de *E2F1* y *p27^{KIP1}*

Una vez identificados los posibles sitios de unión de *ETV5* sobre los genes blanco y de haber diseñado los oligonucleótidos, se optimizaron las condiciones ideales para la amplificación de las regiones promotoras de *E2F1* y *p27^{KIP1}* mediante ensayos de PCR. Para estos ensayos se utilizaron diferentes temperaturas de alineamiento, se probaron distintas concentraciones de Mg^{2+} , se realizaron optimizaciones añadiendo DMSO y se implementaron perfiles térmicos de PCR anidada y PCR *touchdown* (datos no mostrados).

A continuación, se muestran solamente las condiciones óptimas de temperatura de alineamiento para cada fragmento (Tabla 2). Seguido de esto, se amplificaron los segmentos, corroborando su tamaño y purificándolos mediante geles de agarosa (Figura 12A y 12B).

Tabla 2. Temperaturas de alineamiento óptimas para la amplificación de cada fragmento de los promotores de *E2F1* y *p27^{KIP1}*.

Gen	Fragmento	Temperatura de alineamiento	Tamaño del producto
<i>E2F1</i>	ABC	67.0 °C	2116 pb
	BC	64.0 °C	1227 pb
	C	64.5 °C	648 pb
	B	69.0 °C	612 pb
	A	64.5 °C	901 pb
<i>p27^{KIP1}</i>	ABC	60.7 °C	1989 pb
	BC	62.0 °C	1209 pb
	C	64.5 °C	489 pb
	B	62.5 °C	731 pb
	A	60.0 °C	792 pb

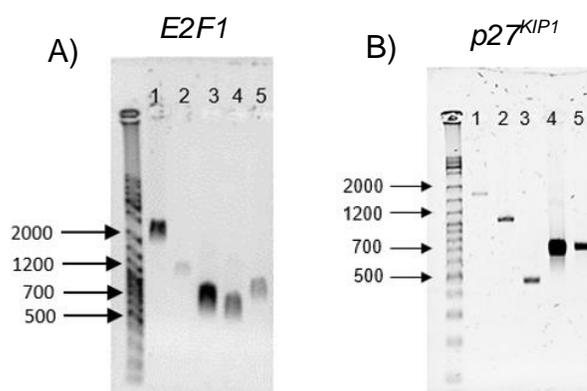


Figura 12. Productos de PCR de los fragmentos de los promotores de *E2F1* y *p27^{KIP1}*. Gel de agarosa 1%. A) Fragmentos de la región promotora de *E2F1*, carril 1 fragmento ABC, tamaño 2116 pb; carril 2 fragmento BC, tamaño 1227 pb; carril 3 fragmento C, tamaño 648 pb; carril 4 fragmento B, tamaño 612 pb; carril 5 fragmento A, tamaño 901 pb. B) Fragmentos de la región promotora de *p27^{KIP1}*, carril 1 fragmento ABC, tamaño 1989 pb; carril 2 fragmento BC, tamaño 1209 pb; carril 3 fragmento C, tamaño 489 pb; carril 4 fragmento B, tamaño 731 pb; carril 5 fragmento A, tamaño 792 pb.

7.4. Clonación y subclonación de las regiones promotoras de *E2F1* y *p27^{KIP1}* a los vectores pGEM y pGL3

Los fragmentos amplificados fueron clonados en un principio en el vector de clonación pGEM-T Easy. Durante la amplificación, la Taq polimerasa coloca adeninas a los extremos de los fragmentos amplificados y estas son complementarias a las timinas de los extremos del vector, lo que facilita la ligación entre el fragmento y el vector (Figura 7).

Después de realizar la clonación, los vectores con las secuencias de estudio se transformaron en bacterias competentes *E. coli* XL10-Gold para su expansión y purificación del plásmido. Esta primera clonación, facilita el ensayo de restricción y ayuda al posicionamiento de las enzimas.

Posteriormente, mediante el uso de enzimas de restricción, las regiones promotoras clonadas en el vector pGEM-T Easy se cortaron y purificaron; así mismo, utilizando las mismas enzimas de restricción, se realizaron cortes en el sitio de clonación múltiple del vector pGL3, lo cual generó extremos pegajosos, favoreciendo la subclonación de las secuencias de estudio en el vector de luciferasa pGL3.

Cada una de las construcciones de cada fragmento de *E2F1* y *p27^{KIP1}* en el vector pGL3 fue enviado a secuenciación. Para aquellas secuencias donde se encontraron mutaciones por error durante la amplificación, se realizó la mutagénesis dirigida hasta obtener los fragmentos sin mutaciones. Los plásmidos secuenciados y verificados son los que se utilizaron en el ensayo de luciferasa.

7.5. Optimización del cultivo celular y ensayo de transfección en placas de 12 pozos

Se optimizó el cultivo de células INS-1, en placas de 12 pozos, para lograr una confluencia máxima a las 72 h (tiempo al que se ha logrado el mejor silenciamiento de *ETV5* en placas de 6 pozo). Se encontró que colocar 3×10^6 células por pozo, es una cantidad adecuada para alcanzar la confluencia deseada a las 72 h.

Posteriormente, se optimizó la cantidad de siC y siE con 20 nM y 30 nM, así como del agente de transfección (AT) con 0.5 y 0.75 μ L, para cada uno. Los resultados mostraron que 20 nM de siRNAs y 0.5 μ L de agente de transfección son óptimos para lograr el silenciamiento parcial de *ETV5* en un 71% respecto a la transfección con siC (Figura 13).

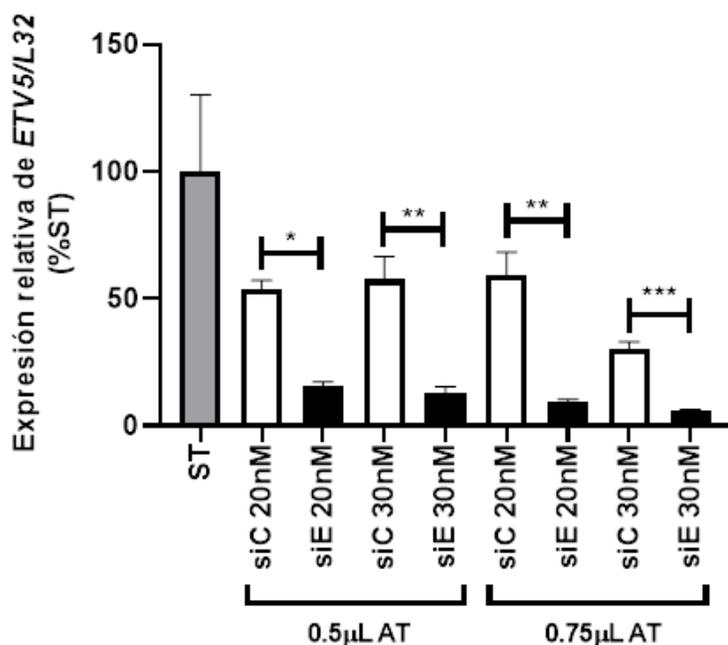


Figura 13 . Expresión relativa de *ETV5*. Optimización del ensayo de transfección en placas de 12 pozos con 20 o 30 nM de siRNA control (siC) o siRNA *ETV5* (siE) y 0.5 o 0.75 μ L de agente de transfección (AT). Se muestra de referencia la transcripción de *ETV5* en células sin tratamiento (ST). T-student, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ $n = 3$. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM.

7.6. Visualización de los plásmidos a transfectar

Una vez que se obtuvieron las condiciones óptimas de transfección y se clonaron las construcciones de los promotores de *E2F1* y *p27^{KIP1}* en pGL3, se cuantificó la concentración de los plásmidos con los diferentes fragmentos de los promotores.

Para poder asegurar que se transfecta con la misma cantidad de todos los plásmidos, la concentración fue determinada mediante espectrofotometría a 260 nm (Figura 14A). Posteriormente, se corroboró mediante el corrimiento electroforético de 300 ng de los plásmidos en un gel de agarosa al 1% (Figura 14B), en el cual se cuantificó la

densitometría de las bandas (Figura 14C). Los resultados de densitometría mostraron que la intensidad de las bandas fue similar entre ellos, por lo cual se continuó con la optimización de los ensayos de luciferasa.

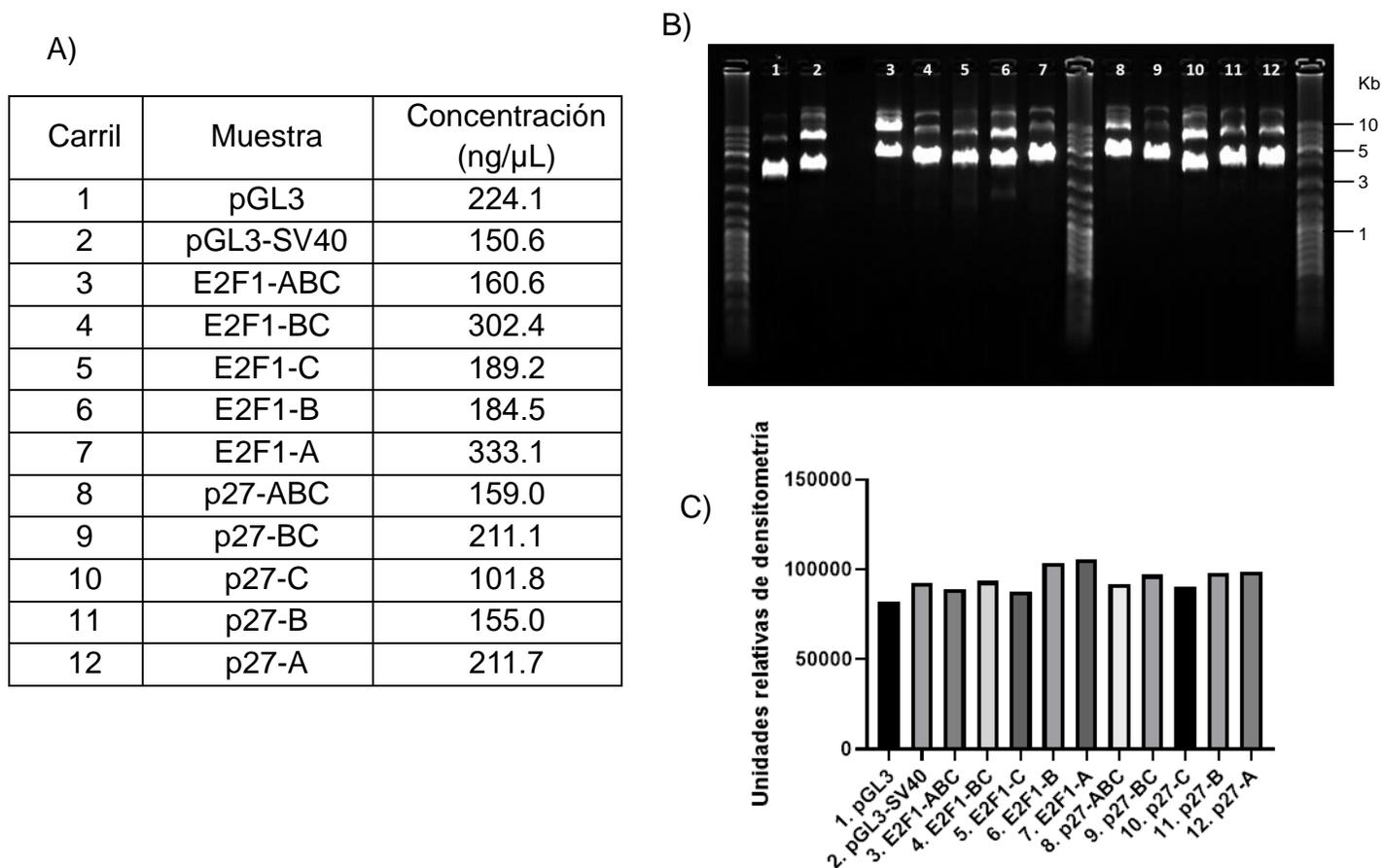


Figura 14. Corrimiento electroforético de las construcciones de los promotores de los genes *E2F1* y *p27^{KIP1}* en el vector pGL3. A) Concentración de los plásmidos utilizados en el ensayo de luciferasa. B) Visualización de las construcciones de pGL3 en gel de agarosa al 1%, se muestran bandas observadas corriendo 300 ng de plásmido en su forma nativa en cada carril. C) Cuantificación de la intensidad de todas las bandas por carril, representadas por unidades relativas de densitometría, cuantificado en ImageJ 1.53k, sin análisis estadístico por ser optimización, n=1.

7.7. Optimización del ensayo de luciferasa

Para optimizar la transfección del vector de luciferasa pGL3 y del vector de renilla pRL (control interno de transfección), las células fueron transfectadas en diferentes condiciones: 1) con 5, 10 y 20 ng del vector pRL, 2) con 250, 500 y 750 ng de pGL3 con el promotor de *p27^{KIP1}* (pGL3-p27-ABC), 3) una combinación de 10 y 20 ng del vector pRL con 500 ng de pGL3 virgen y 4) una combinación de 10 y 20 ng del vector pRL con 500 ng de pGL3-p27-ABC (Figura 15A, 15B y 15C). De la misma forma, se realizó la optimización para la construcción de pGL3 con el promotor de *E2F1* (pGL3-E2F1-ABC), transfectando con las condiciones: 1) con 5, 10 y 20 ng del vector pRL, 2) transfectando con 500, 750 y 1000 ng de pGL3-E2F1-ABC, 3) una combinación de 10 y 20 ng del vector pRL con 750 ng de pGL3 virgen y 4) una combinación de 10 y 20 ng del vector pRL con 750 ng de pGL3-E2F1-ABC (Figura 15D, 15E y 15F).

Los resultados mostraron una señal basal de luciferasa de luciérnaga en los controles negativos y en el vector pGL3 virgen. Sin embargo, la señal expresada por el vector pGL3-p27-ABC aumentó entre 250 ng y 500 ng, mientras que disminuyó con 750 ng. Al cotransfectar con pGL3-p27-ABC con 10 y 20 ng de pRL, se obtuvieron valores 8 veces por arriba del vector pGL3 virgen, los cuales fueron similares al cotransfectar diferentes cantidades de pRL (Figura 15A). Respecto a la señal de la luciferasa de renilla, se encontró correlación entre la cantidad del vector transfectada (5, 10 y 20 ng) y la cantidad de luminiscencia medida (Figura 15B). De acuerdo con estos resultados, al realizar la relación de señal de luciferasa de luciérnaga con la de luciferasa de renilla (control interno de transfección), la condición en donde se observó una mejor resolución entre pGL3 virgen y pGL3-p27-ABC fue con 500 ng del vector pGL3-p27-ABC y 20 ng del vector pRL. Por lo que, esta condición fue la que se utilizó en los siguientes experimentos (Figura 15C).

En el caso de la optimización con la construcción pGL3-E2F1-ABC, la señal de luciferasa de luciérnaga aumentó entre 500 ng y 750 ng, mientras que con 1000 ng se muestra una luminiscencia similar que con 750 ng. Como era de esperarse, no se encontró señal en donde sólo se transfectó con pRL. Al cotransfectar pGL3 virgen con 10 y 20 ng de pRL, se obtiene una señal de luminiscencia similar a la cotransfección

con pGL3-E2F1-ABC con 10 y 20 ng de pRL. Sin embargo, hay mayor señal al cotransfectar 750 ng de cada vector pGL3 con 20 ng de pRL (Figura 15D). En la señal de la luciferasa de renilla, la señal aumentó con la cantidad del plásmido (Figura 15E). Al hacer la relación entre la señal de luciferasa y renilla, se encontró que la condición en donde se obtiene una mejor separación entre el control pGL3 virgen y pGL3-E2F1-ABC fue en donde se transfectó con 750 ng del vector pGL3-E2F1-ABC y 20 ng del vector pRL. Por lo tanto, se utilizó esta condición para evaluar la actividad transcripcional de *ETV5* sobre las construcciones del promotor *E2F1* (Figura 15F).

Para optimizar la transfección del vector de luciferasa pGL3 y del vector de renilla pRL, las células fueron transfectadas con 5, 10 y 20 ng del vector pRL, así como con 250, 500 y 750 ng de la construcción de pGL3 con el promotor de *p27^{KIP1}* (pGL3-p27-ABC) y combinaciones del vector pRL (10 y 20 ng) con pGL3-p27-ABC (500 ng), además de pGL3 virgen (500 y 750 ng). Esto se repitió para la construcción de pGL3 con el promotor de *E2F1* (pGL3-E2F1-ABC, transfectando con 500, 750 y 1000 ng).

p27^{KIP1}

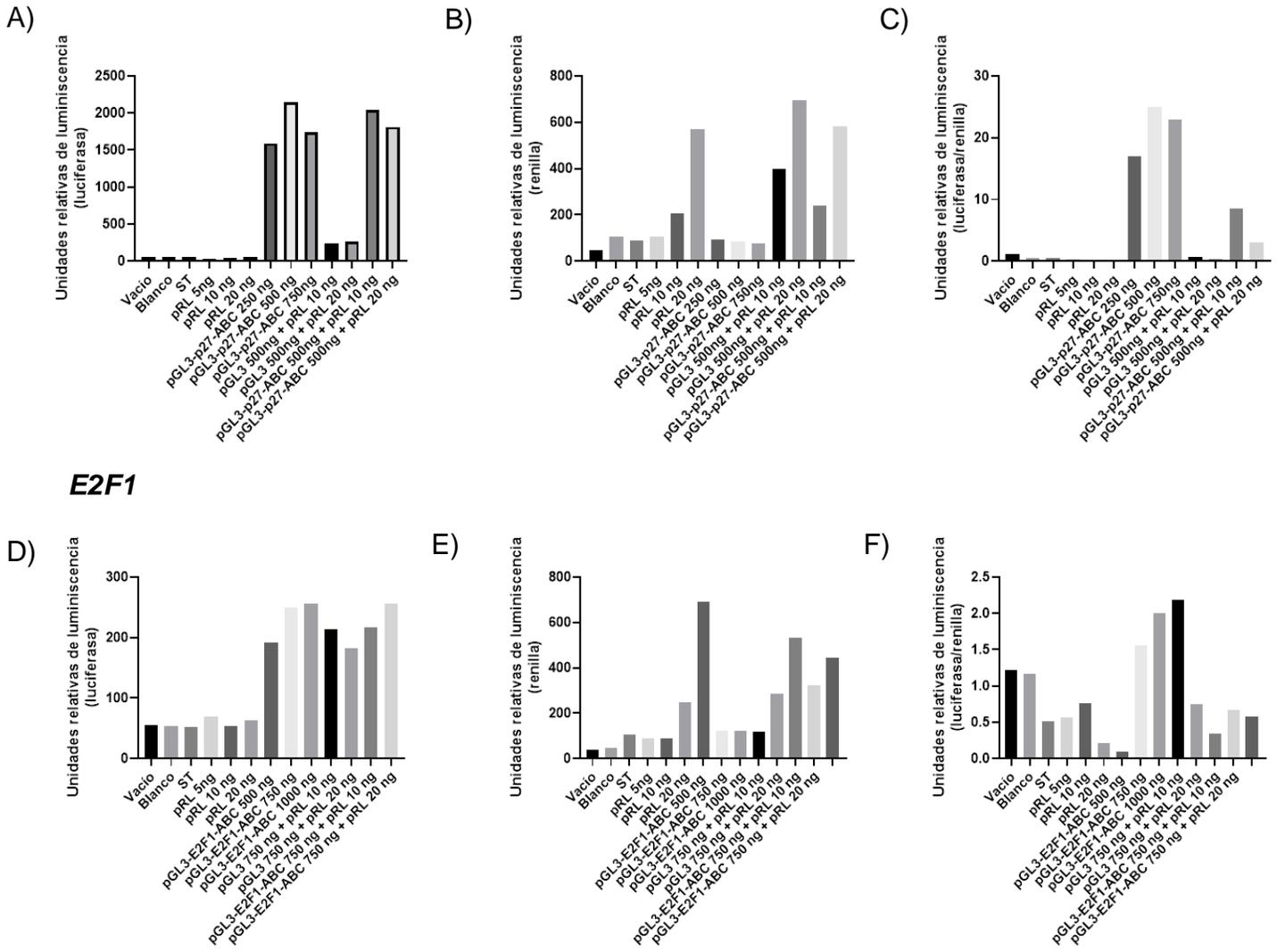


Figura 15. Optimización de la transfección con los vectores pRL y pGL3. A) Resultados de luminiscencia de luciferasa de luciérnaga y B) luciferasa de renilla para la construcción pGL3-p27-ABC. C) Relación de la luminiscencia de luciferasa de luciérnaga entre la luciferasa de renilla para la construcción pGL3-p27-ABC/pRL. D) Resultados de luminiscencia de luciferasa de luciérnaga y E) luciferasa de renilla para la construcción pGL3-E2F1-ABC. F) Relación de la luminiscencia de luciferasa de luciérnaga y luciferasa de renilla para la construcción pGL3-E2F1-ABC/pRL. Los resultados se presentan sin análisis estadístico, ya que sólo se realizó un experimento (n=1) para optimizar las condiciones experimentales.

7.8. Actividad del promotor de *p27^{KIP1}* en presencia o ausencia parcial de *ETV5*

Para poder determinar la actividad transcripcional de *ETV5* sobre los promotores de *p27^{KIP1}* y *E2F1*, se realizaron los ensayos de luciferasa. En estos ensayos se utilizaron diferentes controles negativos, dentro de los cuales se midió la luminiscencia de un tubo sin muestra (vacío) y un tubo en donde se colocaron los sustratos de luciferasa con el buffer de lisis (blanco) y células en tres diferentes condiciones, sin transfectar (ST), transfectadas con siRNA control (siC) y siRNA *ETV5* (siE) (datos no mostrados). Por otro lado, como control positivo se utilizó pGL3 con el promotor constitutivo SV40 (pGL3 SV40) y para observar la luminiscencia basal del vector pGL3, se transfectó con el vector virgen (pGL3 vacío).

En la Figura 16A, se muestran las diferentes construcciones del promotor de *p27^{KIP1}* en pGL3 que se analizaron, señalando los sitios específicos de unión de *ETV5* sobre este promotor. De acuerdo con las optimizaciones realizadas, las condiciones de transfección para las construcciones del promotor *p27^{KIP1}* fueron: 500 ng de pGL3, 20 ng de pRL y 20 nM de siRNAs.

En un primer análisis de datos, se observó que los resultados de luciferasa mostraron una tendencia a la baja cuando se silenció parcialmente a *ETV5*, incluso en los resultados de las condiciones con el control interno (luciferasa de renilla). Sabiendo que *ETV5* influye en la proliferación celular, ocasionando un menor número de células, es posible que la baja en expresión de luciferasa se debía a un menor número de células (datos no mostrados). Debido a esta razón, se decidió normalizar los datos obtenidos por la cantidad de proteína total en las muestras evaluadas.

Al normalizar los datos por la cantidad de proteína total, se observó que la señal relativa de luciferasa del control positivo pGL3 SV40, es en promedio 4 veces mayor que la del vector pGL3 vacío, datos que validaron este ensayo (Figura 16B). En las construcciones p27-ABC, p27-BC y p27-C, la señal relativa de luciferasa aumentó en 7, 6 y 13 veces respectivamente, en comparación con el vector pGL3 vacío. En el caso de las construcciones p27-B y p27-A, la señal relativa de luciferasa fue similar a la señal basal de pGL3 vacío (Figura 16B). Sin embargo, para ninguna de las construcciones se obtuvo

una diferencia entre las células control y silenciadas parcialmente de *ETV5*. Esto sugiere que *ETV5* no tiene actividad transcripcional sobre el promotor de *p27^{KIP1}*.

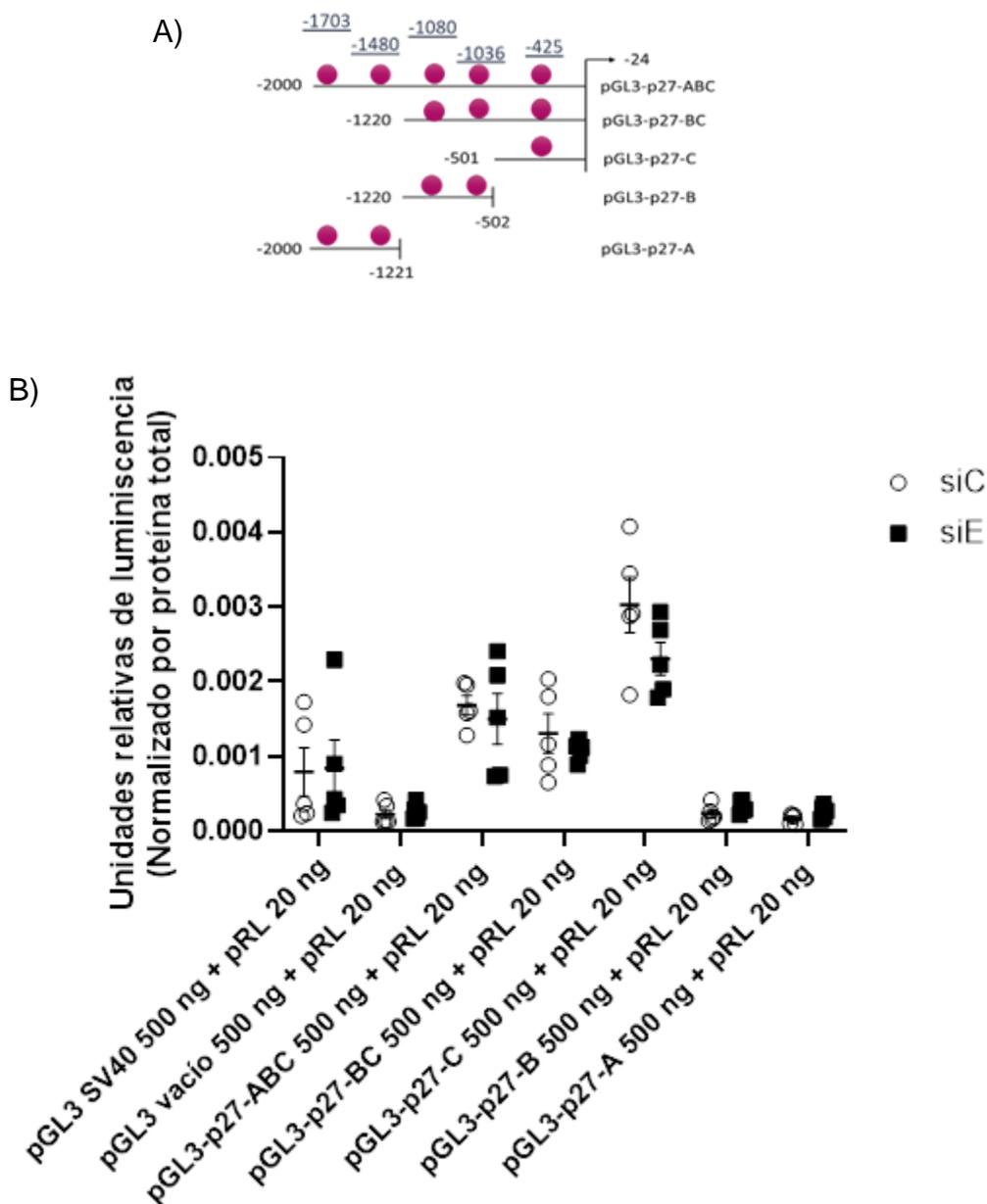


Figura 16. Ensayo de luciferasa para medir la actividad del promotor del gen *p27^{KIP1}* en ausencia parcial de *ETV5*. A) Sitios de unión de *ETV5* a la región promotora de *p27^{KIP1}*. B) Resultados de la relación entre luciferasa/renilla y normalizada por la cantidad de proteína total en células INS-1 (832/13) transfectedas con siRNA control (siC) y siRNA *ETV5* (siE). Plásmido de renilla (pRL). T-student. Los resultados son presentados como el promedio ± SEM, n=5.

7.9. Actividad del promotor *E2F1* en ausencia parcial de *ETV5*

Además, se evaluó si *ETV5* puede regular transcripcionalmente a *E2F1*, con las construcciones del promotor de *E2F1* en pGL3 (Figura 17A), utilizando condiciones previamente optimizadas: 750 ng de pGL3, 20 ng de pRL y 20 nM de siRNAs.

Como se explicó anteriormente, los resultados obtenidos de luciferasa se normalizaron por la cantidad de proteína total como se describió para *p27^{KIP1}*. En este caso, se observó que la señal relativa de luciferasa del control positivo pGL3 SV40, fue en promedio 3 veces mayor que la del vector pGL3 vacío, lo que validó este ensayo. Respecto a las construcciones del promotor *E2F1*, la señal relativa de luciferasa en todos los casos, mostró un aumento de 1 a 2 veces más en comparación con el vector pGL3 vacío (Figura 17B). Por otro lado, sólo la construcción E2F1-BC, mostró una disminución significativa de la señal relativa de luciferasa (32%), al silenciar parcialmente a *ETV5* (Figura 17B). Esto sugiere que *ETV5* regula transcripcionalmente la región de -1220 a -24 del promotor de *E2F1* (región E2F1-BC).

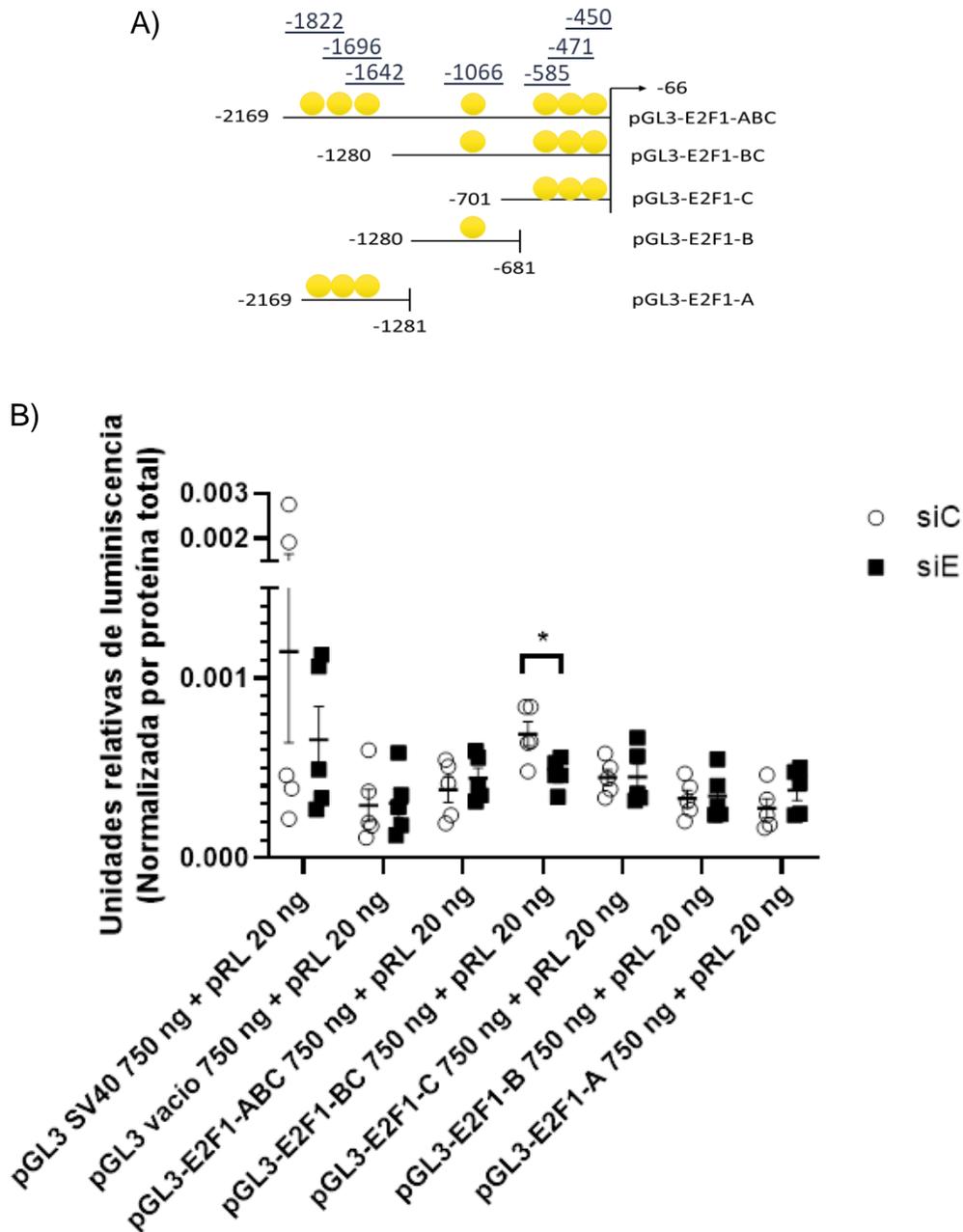


Figura 17. Ensayo de luciferasa para medir la actividad del promotor del gen *E2F1* en ausencia parcial de *ETV5*. A) Sitios de unión de *ETV5* al promotor de *E2F1*. B) Resultados de la relación entre luciferasa, renilla y cantidad de proteína total en células INS-1 (832/13) transfectadas con siRNA control (siC) y siRNA *ETV5* (siE). T-student. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM, * $p < 0.05$, $n = 5$.

7.10. Remodelación del citoesqueleto

Al disminuir a *ETV5* en la línea celular INS-1 (832/13), se redujo la proliferación celular (Díaz-López 2020). Una posible causa podría ser la modificación del citoesqueleto a través de los filamentos de actina. Esto podría ocurrir al modificar la polimerización y disposición de los microfilamentos de actina, lo cual se sabe que tiene repercusiones sobre la proliferación celular.

Después de transfectar a las células con siC y siE, se tiñeron a las células con faloidina, el cual es un péptido bicíclico considerado como una toxina por tener alta afinidad a los filamentos de actina y evitar su despolimerización. La faloidina, está acoplada al fluorocromo Alexa Flúor 488 y de esta forma, se puede evidenciar la disposición de los filamentos de actina en las células (Chazotte 2010).

Para realizar este ensayo, se utilizaron 3 condiciones: células sin ningún tratamiento (ST), células transfectadas con siC y células transfectadas con siE. Se encontró que al disminuir a *ETV5* (Figura 18A), las células tienden a formar mayor número de cúmulos y tienen menor cantidad de extensiones citoplasmáticas, comparadas con las células control, ST y siC. Además, hay una mayor disposición de filamentos de F-actina (Figura 18B). Lo anterior, evidencia que en ausencia parcial de *ETV5* se presenta un aumento en la polimerización de los filamentos de actina, que se puede correlacionar con la evidencia en la disminución de la proliferación celular, ya que esto puede ocasionar la interrupción del ciclo celular (Heng y Koh 2010).

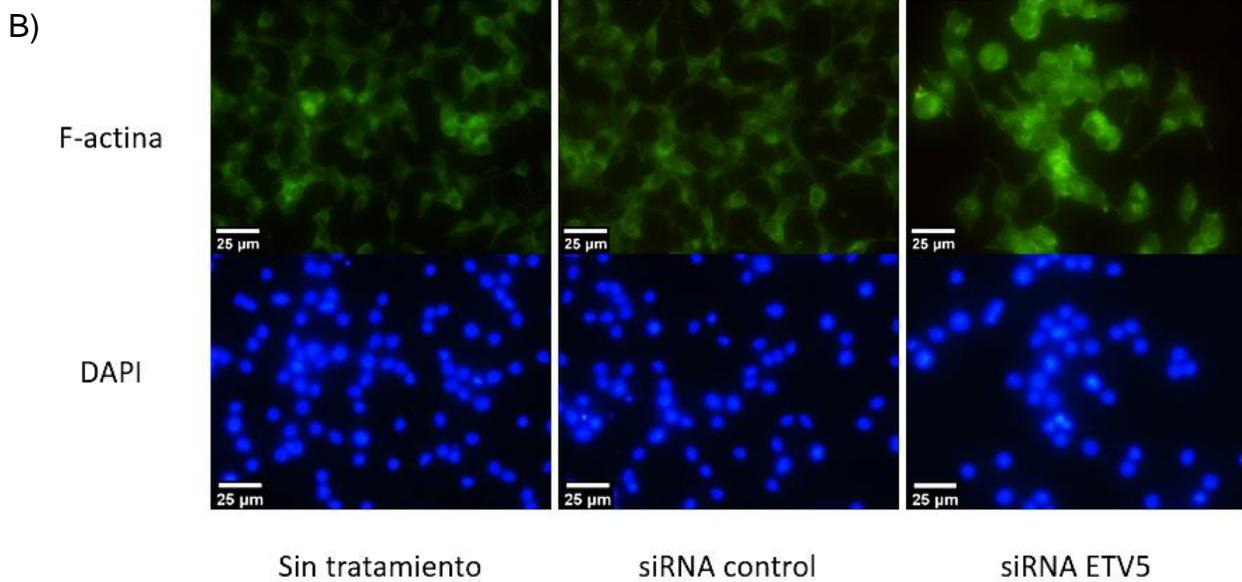
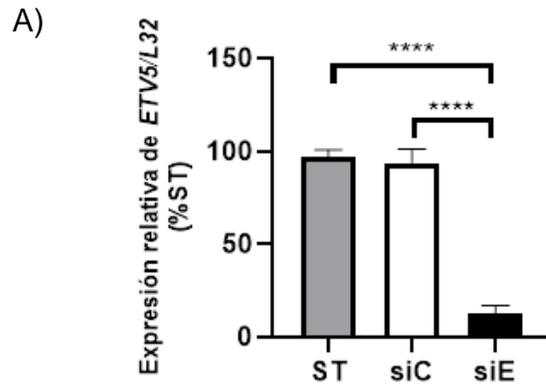


Figura 18. Tinción de F-actina en las células INS-1 (832/13) después del silenciamiento parcial de *ETV5*. A) Expresión relativa de *ETV5*, después de transfectar las células con siRNA control (siC) y siRNA *ETV5* (siE.) La comparación se realizó respecto a las células sin tratamiento (ST), prueba ANOVA de una vía, **** $p < 0.0001$, $n = 3$, los resultados son presentados como el promedio \pm SEM. B) Tinción de F-actina con faloidina (color verde), evaluación en tres condiciones, células ST, siC y siE. Tinción con DAPI (color azul), colorante de unión al núcleo. Fotos representativas de cada tratamiento, aumento 40x, $n = 3$

7.11. Evaluación de marcadores de cambio mesenquimal-epitelial (MET)

La transición de un fenotipo mesenquimal a epitelial (MET), se correlaciona con cambios a nivel de proliferación celular (Pastushenko y Blanpain 2019). El cambio de fenotipo epitelial se puede asociar con una menor proliferación celular, mientras que la transición a un fenotipo mesenquimal se correlaciona con un aumento de la proliferación celular. Debido a esto, se estudió si existía una transición de fenotipo en las células INS-1(832/13) después de silenciar parcialmente a *ETV5*.

Para realizar este ensayo, se utilizaron 3 diferentes condiciones: células ST, células transfectadas con siC y células transfectadas con siE, verificando el descenso del transcrito mediante ensayos de qPCR (Figura 19A).

Como primera parte, se evaluó mediante ensayos de inmunohistoquímica, la cantidad de E-cadherina, la cual es una proteína de adhesión celular, abundante en células con fenotipo epitelial (Petrova, Schecterson, y Gumbiner 2016). En el caso de E-cadherina(Figura 19B) se observó de manera cualitativa un aumento en la tinción de dicha proteína, al silenciar a *ETV5*. Por otra parte, de manera semicuantitativa podemos encontrar que existe un aumento del 41.7% y 28.5 % en la intensidad de fluorescencia cuando se silencia a *ETV5*, respecto de las células sin tratamiento (ST) y a las células transfectadas con siRNA control (siC), respectivamente (Figura 19C). Finalmente, estos resultados se asocian a un fenotipo epitelial y con los hallazgos de la reducción en la proliferación celular.

Por otra parte, se evaluó mediante inmunohistoquímica, la cantidad de vimentina (Figura 19D). La vimentina es una proteína de los filamentos intermedios del citoesqueleto, la cual es abundante en células con fenotipo mesenquimal (C. Y. Liu et al. 2015). Al realizar estos ensayos, se observó de manera cualitativa una disminución de la tinción, cuando se silencia parcialmente a *ETV5*, respecto de ST y siC. Posteriormente, al evaluar la intensidad de fluorescencia relativa, se encontró que de forma semicuantitativa sólo existe diferencia entre siC y siE, en el cual se obtuvo una disminución del 17.5% en ausencia parcial de *ETV5* (Figura 19E). Estos resultados sugieren que al silenciar a *ETV5*, se disminuye la cantidad de vimentina presente en las

células, lo cual indica un fenotipo epitelial y explica la razón de una disminución en la proliferación de las células INS-1 (832/13).

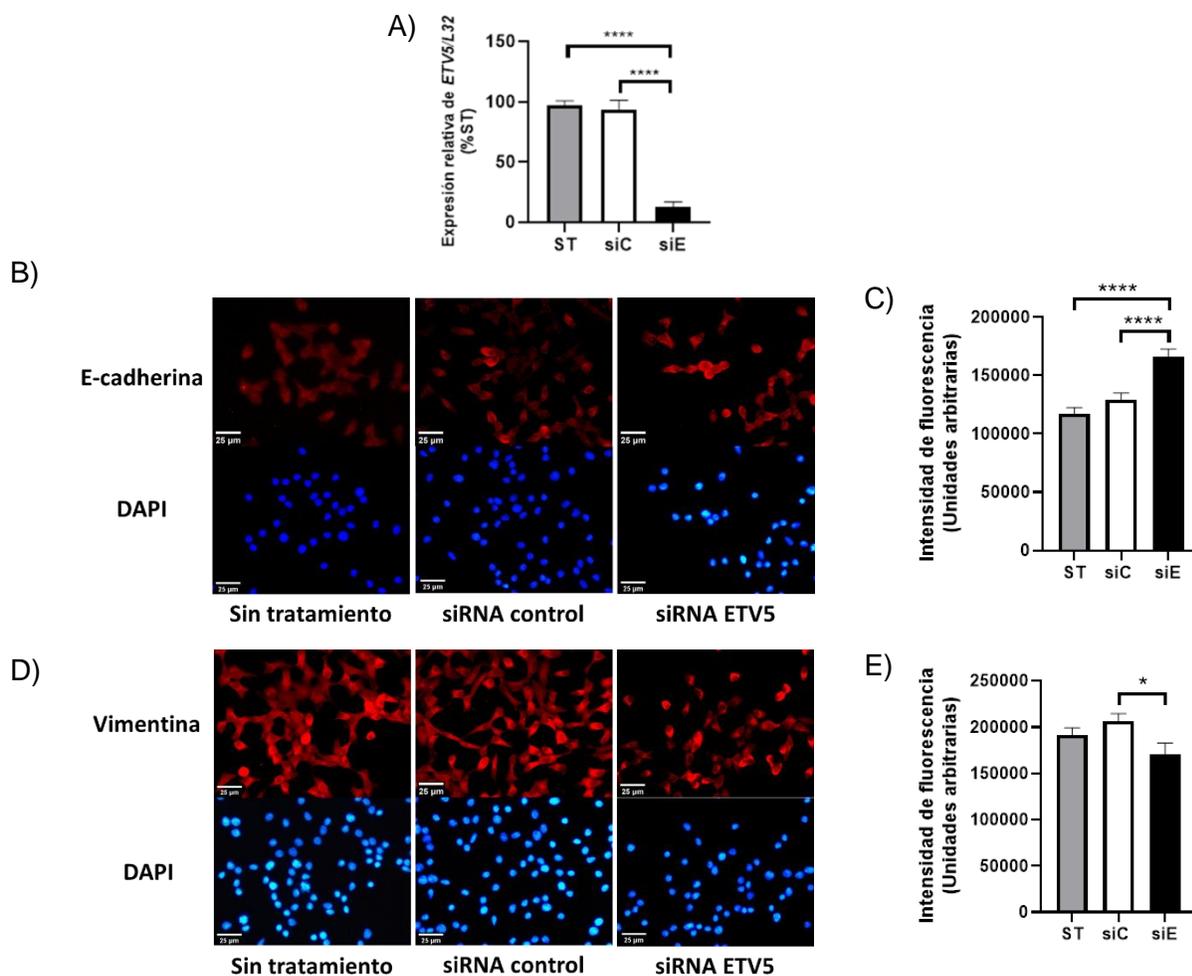


Figura 19. Inmunotinción de marcadores MET en la línea celular INS-1 (832/13) después del silenciamiento parcial de *ETV5* a las 72 horas post-transfección. A) Expresión relativa de *ETV5*, transfección con siRNA control (siC) y siRNA *ETV5* (siE), comparación respecto a las células sin tratamiento (ST). B) Inmunotinción de E-cadherina, marcador de fenotipo epitelial (color rojo). C) Intensidad de fluorescencia de E-cadherina. D) Inmunotinción de vimentina, marcador de fenotipo mesenquimal (color rojo). E) Intensidad de fluorescencia de vimentina. Tinción con DAPI (color azul), colorante de unión al núcleo. ANOVA de una vía, * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$, $n = 3$. Resultados presentados como el promedio \pm SEM. Fotos representativas de cada tratamiento, aumento 40x. Se analizaron 6 campos de cada preparación celular.

7.12. Evaluación de la migración celular al silenciar parcialmente a *ETV5* en las células INS-1 (832/13)

Para continuar con el estudio de MET en las células INS-1 (832/13), después de silenciar parcialmente a *ETV5*, se evaluó la migración celular. Se sabe que el fenotipo epitelial está asociado con una menor migración celular, mientras que el fenotipo mesenquimal aumenta la migración celular.

Para evaluar la migración celular, se realizaron ensayos de herida durante el ensayo de transfección, evaluando tres condiciones: células ST, células transfectadas con siC y células transfectadas con siE. Se observó que, al cabo de 72 horas de transfección, las células transfectadas con siE presentaron una menor migración celular, respecto a las células ST y células transfectadas con siC (Figura 20A).

Teniendo como antecedente que al disminuir a *ETV5* se reduce la proliferación celular, la evaluación de la migración celular podría estarse sesgando por esta condición. Debido a esta razón, se realizó un nuevo experimento utilizando colchicina. La colchicina es un pseudoalcaloide, el cual se une a la tubulina inhabilitando el ensamble mitótico, de esta forma se inhibe la proliferación celular (Dubey et al. 2017). El experimento en presencia de colchicina (Figura 20B) mostró que al silenciar parcialmente a *ETV5* hay una menor migración respecto a las células control (ST y siC), corroborando que la disminución en la migración sucede independientemente de la proliferación. Lo anterior indica que al disminuir a *ETV5*, existe una menor migración, lo cual es característico de un fenotipo epitelial, que además se asocia con una disminución de la proliferación celular.

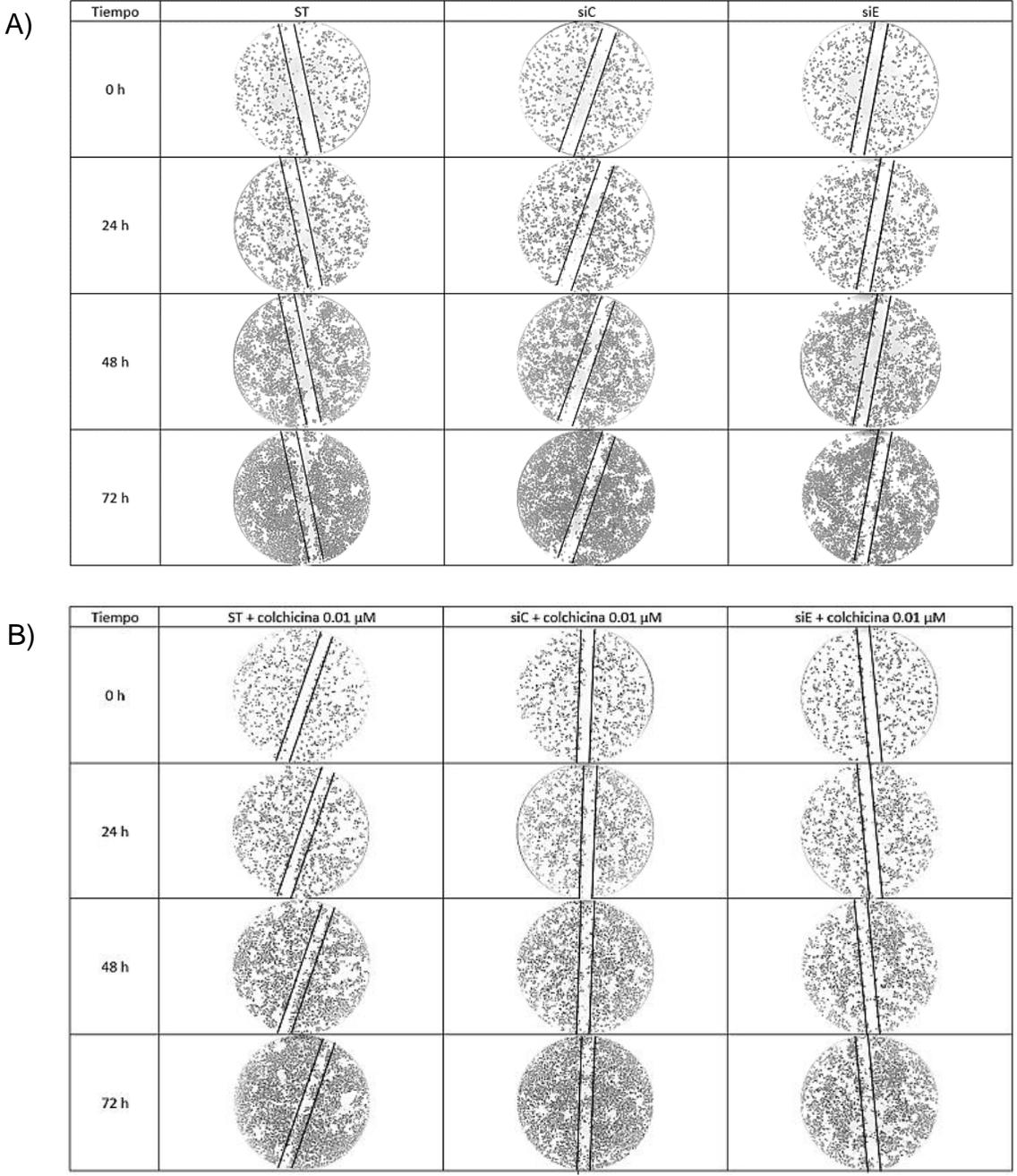


Figura 20. Ensayo de herida en las células INS-1 (832/12) durante diferentes tiempos del silenciamiento parcial de *ETV5*. A) Migración de las células durante el ensayo de transfección. B) Migración de las células durante el ensayo de transfección, en presencia de colchicina (inhibidor de la proliferación celular). Imágenes capturadas cada 24 h. Fotos representativas de cada tratamiento, aumento 10x, n=3.

7.13. Ultraestructura de las células INS-1 (832/13) al silenciar parcialmente a *ETV5*

Una vez que se comprobó que el silenciamiento de *ETV5* provocaba un cambio de fenotipo mesenquimal a epitelial, se quiso analizar si había otros cambios morfológicos en ausencia de este gen. Es por esto que se analizaron a las células a nivel de ultraestructura por medio de microscopía electrónica de transmisión. Para realizar este ensayo, se utilizaron 3 condiciones: células ST, transfectadas con siC y transfectadas con siE.

Primero, se capturaron imágenes de las células en una escala de 2 μm , observando el aspecto del corte y de las células de manera panorámica (Figura 21, columna A). En estas imágenes, se observó la presencia del núcleo y algunas estructuras del contenido citoplasmático. En las tres condiciones de estudio ST, siC y siE, fue evidente la estructura del aparato de Golgi (AG) y el núcleo (N). En el caso de las células ST y transfectadas con siC, no se observaron cambios en la proporción del contenido celular. Sin embargo, al analizar las células transfectadas con siE, se apreció una acumulación de vesículas con gránulos electrodensos (vesículas con insulina), cercanos a la membrana citoplasmática y que tienen un mayor tamaño (hipertrofia), en comparación con las células ST y transfectadas con siC.

Después, se capturaron imágenes a escala de 1 μm , en este caso, se observó nuevamente la estructura del núcleo, mitocondrias y un mayor detalle del AG (Figura 21, columna B). En el caso del AG, se evidenció una hipertrofia del AG en las células transfectadas con siE. Interesantemente, se observó la presencia de gránulos electrodensos en las tres condiciones, todos ubicados en la cercanía de la membrana citoplasmática. Con respecto a las vesículas de insulina, se reconoció al menos una en las células transfectadas con siC; sin embargo, se observó un gran número de vesículas en ausencia parcial de *ETV5*.

En un acercamiento al AG a una escala de 0.5 μm (Figura 21, columna C), se observó a mayor detalle este organelo y se hizo evidente la presencia del retículo endoplásmico rugoso, que se interna en el complejo del AG (característica del linaje celular).

En otras tomas, a escalas de 200 y 500 μm (Figura 21, columna D), se capturó la estructura de las mitocondrias, en las tres condiciones estudiadas. Se evidenció que en las células ausentes de *ETV5*, se presentaron mitocondrias de mayor tamaño, respecto a las otras dos condiciones.

Finalmente, se estudió a detalle la liberación de vesículas a nivel de la membrana citoplasmática (Figura 21, columna E). Se observó, que en el caso de las células en donde se disminuyó a *ETV5*, existen muchas vesículas cercanas a la membrana celular y que no logran desprenderse, en comparación con los otros dos tratamientos, en donde se puede apreciar la fusión y vaciamiento del contenido de las vesículas (Figura 21, columna F).

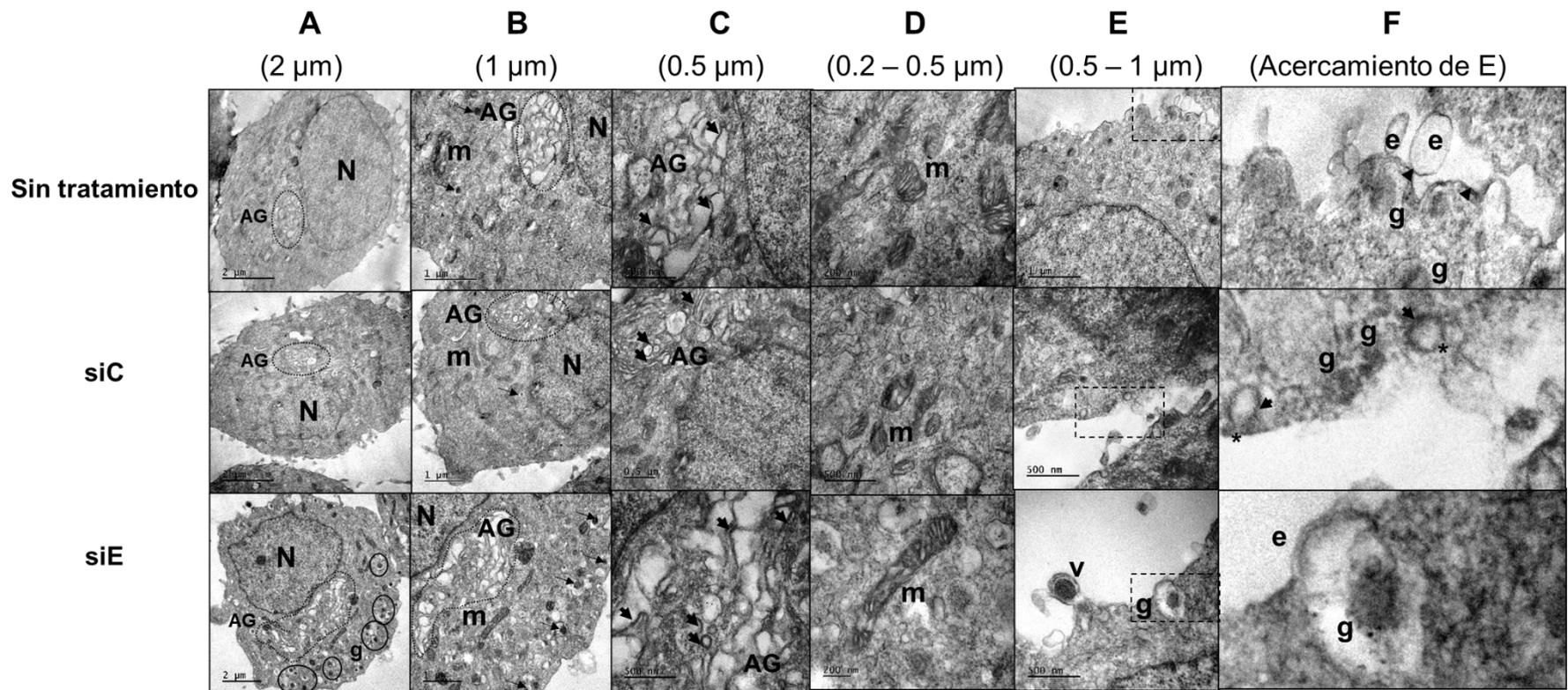


Figura 21. Ultraestructura de las células INS-1 (832/13) después silenciar parcialmente a *ETV5*. Columna A) Vista del corte en forma panorámica, imágenes a escala de 2 μ m. AG delimitado en la región punteada, gránulos delimitados con círculos. Columna B) Enfoque del contenido citoplasmático celular, escala de 1 μ m. AG delimitado en la región punteada, gránulos indicados con flechas. Columna C) Observación del AG a escala de 0.5 μ m. Retículo endoplásmico rugoso, señalado con flechas. Columna D) Enfoque de las mitocondrias a escala de 0.2 μ m para células sin tratamiento (ST) y células transfectadas con siRNA *ETV5* (siE), y a escala de 0.5 μ m para células transfectadas con siRNA control (siC). Columna E) Acercamiento a vesículas en proceso de exocitosis, imágenes a escala de 0.5 μ m para células siC y siE, y a escala de 1 μ m para ST. Columna F) Acercamiento de la sección delimitada en Columna E. Vesículas que vaciaron su contenido señaladas con cabeza de flecha, punto de fusión abierto marcado con asterisco. En este ensayo se utilizaron células en tres condiciones ST, transfectadas con siC y transfectadas con siE. Abreviaturas: núcleo (N), aparato de Golgi (AG), mitocondria (m), gránulo (g), vesícula (V), proceso de exocitosis (e).

8. Discusión

8.1. ETV5 regula la proliferación celular vía $p27^{KIP1}$ y E2F1

Previamente, en estudios realizados por nuestro grupo de trabajo, se encontró que al disminuir a *ETV5*, se reduce la secreción de insulina en la línea celular INS-1 (832/13), debido al control transcripcional de genes involucrados en la exocitosis de esta hormona (Gutierrez-Aguilar et al. 2014). Además, se encontró que los ratones *ETV5* KO presentan un páncreas con un menor número y tamaño de islotes de Langerhans, así como una tendencia a la disminución de masa de células beta (Gutierrez-Aguilar et al. 2014).

Se ha descrito que para que haya una correcta secreción de insulina es necesario que exista una cantidad adecuada de masa de células beta. Además, estas células deben de tener un tamaño y número adecuado, lo cual está regulado por la proliferación celular (Szabat et al. 2016; Böni-Schnetzler et al. 2018).

En nuestro modelo, las células INS-1 (832/13), hemos observado que en ausencia parcial de *ETV5* existe una reducción en la proliferación celular (Díaz-López 2020). Por lo tanto, en este trabajo se quiso estudiar la regulación transcripcional de *ETV5* sobre sus genes blanco que pudieran detener la proliferación celular.

Se sabe que E2F1 es un factor transcripcional que regula la expresión de genes involucrados en diversos procesos celulares. Entre ellos se encuentra el control transcripcional de genes relacionados al avance del ciclo celular a nivel de G1/S y la regulación de este, sucede por su unión a la familia de proteínas RB (Ivanchuk et al. 2004; Denechaud, Fajas, y Giralt 2017). Por otra parte, $p27^{KIP1}$ es un inhibidor de ciclo celular, el cual funciona uniéndose a los complejos CDK-ciclina, inhibiendo su acción de cinasa y el progreso de la fase G1 a la S (Besson, Dowdy, y Roberts 2008).

En estudios previos, se habían evaluado posibles genes blanco de *ETV5*, relacionados al avance del ciclo celular (Díaz-López 2020). Cuando se silenció a *EVT5* en el modelo de células INS-1 (832/13), se observó una menor proliferación, por lo que nuestra hipótesis era que la expresión de genes reguladores de la transición G1/S estaría

disminuida. Sin embargo, no fue así, ya que se encontró que *E2F1* y *p27^{KIP1}* estaban sobreexpresados en ausencia parcial de *ETV5*.

En nuestro modelo de estudio podemos observar que al transfectar por 72 horas con siC y siE a las células INS-1 (832/13), el transcrito disminuye en un 50 %, mientras que los niveles de proteína disminuyen en un 20%. Aunque esta metodología genera un silenciamiento parcial de *ETV5*, los cambios que se observan en las células INS-1 (832/13), resultan evidentes y suficientes para su estudio, como previamente ha sido reportado (Gutierrez-Aguilar et al. 2014)

Actualmente, se ha descrito que existe un mecanismo no convencional por el cual *E2F1* regula la expresión de *p27^{KIP1}*. En un modelo de células hepáticas, se evidenció que el estímulo con la proteína p40, detiene el ciclo celular en la fase G1 y se comprobó que esto se debe a la inducción de *E2F1* aumentando la actividad promotora de *p27^{KIP1}*, por su unión directa en la región promotora de -1740 a -873 (Duan et al. 2017).

Por otra parte, se describió que la expresión del RNA largo no codificante *GAS5*, puede inhibir la proliferación celular en un modelo de cáncer de próstata. Se comprobó que *GAS5* es capaz de unirse a *E2F1* y potenciar su unión al promotor de *p27^{KIP1}*, lo cual detiene a las células en la transición G1/S del ciclo celular (Luo et al. 2017).

De acuerdo con lo anterior, nuestros resultados sugieren que en las células INS-1 (832/13), *ETV5* pudiera estar funcionando como un represor transcripcional de *E2F1* o *p27^{KIP1}*, ya que cuando se reduce a *ETV5*, se observa una sobreexpresión de ambos genes. Respecto a la función de *ETV5* como represor, se ha descrito que es capaz de inhibir la expresión de los genes *Shh* (encargado del desarrollo de extremidades) y *NEUROG2* (gen de diferenciación neuronal) (Z. Zhang et al. 2009; Y. Liu y Zhang 2019).

Al evaluar la actividad transcripcional de *p27^{KIP1}* y *E2F1* por medio de los ensayos de luciferasa, al silenciar parcialmente a *ETV5* en las células INS-1 (832/13), los resultados sugieren que no existe un control transcripcional sobre el promotor de *p27^{KIP1}*. Con respecto al promotor de *E2F1*, se encontró que en ausencia parcial de *ETV5* disminuyó la actividad transcripcional en la región promotora de -1220 a -24. Sin embargo, estos resultados no concuerdan con la hipótesis propuesta, pues se esperaba que al silenciar

a *ETV5*, la actividad de luciferasa aumentara, ya que la expresión del gen *E2F1* a nivel de transcrito y de proteína aumentó.

Podría existir la posibilidad de que *ETV5* no tenga una regulación directa sobre la región promotora de *E2F1* y que al haber una sobreexpresión de *E2F1*, se presente un mecanismo de compensación, a través del cual el mismo *E2F1* inhiba su expresión, razón por lo cual, la actividad transcripcional de *E2F1* podría haber disminuido en el ensayo de luciferasa. Para comprobar esta nueva hipótesis, se deberá silenciar a *ETV5* y bloquear la transcripción y traducción, para así inhibir el aumento de *E2F1* a nivel de transcrito y de proteína y evitar este posible mecanismo de compensación en el ensayo de luciferasa. Por otra parte, también se podría realizar un experimento donde se silencie a *ETV5* y a *E2F1* al mismo tiempo, de tal forma que *E2F1* no ejercería su función sobre *p27^{KIP1}* y no se afectara la proliferación celular.

En relación con lo anterior, se ha encontrado que *ETV4* y *ETV5* actúan como activadores transcripcionales de *E2F1* en células de sarcoma sinovial, lo cual podría corroborar los resultados descritos en el modelo simplificado del ensayo de luciferasa (DeSalvo et al. 2021). Sin embargo, esto no explica por qué aumenta la cantidad de transcrito y proteína de este gen, al silenciar parcialmente a *ETV5* en las células INS-1 (832/13).

Además, debido a que el ensayo de luciferasa sólo evalúa 2 kilobases de la región promotora, no es posible analizar las interacciones tridimensionales del genoma con elementos de regulación distal, los cuales, resultan importantes en la regulación transcripcional de un gen (Andersson, Sandelin, y Danko 2015) y podrían estar participando en la regulación transcripcional de *E2F1*. Esto representa una limitante para los ensayos de luciferasa, por lo cual se deberá analizar por otra parte, la unión directa de *ETV5* al promotor de *E2F1* por medio del ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina.

Por otra parte, se ha reportado que en diferentes modelos celulares el gen homólogo del oncogén viral de la mielocitomatosis aviar (*c-Myc*), es capaz de funcionar como un represor del gen *p27^{KIP1}* (Yang et al. 2001). En una línea celular de fibroblastos humanos, *c-Myc*, es capaz de interactuar con *ETV5* regulando la expresión del gen de

la telomerasa, mecanismo que depende de elementos de regulación distal (F. Zhang, Wang, y Zhu 2020). Además, se ha descrito que en células de glioma el silenciamiento de la catepsina B y el receptor del activador del plasminógeno de urocinasa, disminuyen la fosforilación de la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK 1/2), en consecuencia, hay una disminución en la expresión de c-Myc y un aumento en la expresión de E2F1, lo cual causa un aumento en la expresión de $p27^{KIP1}$ (Gopinath et al. 2011). Aunado a lo anterior, se sabe que la fosforilación de ERK 1/2, también está relacionada a la activación de ETV5 (Puli et al. 2018). Lo anterior sugiere que, puede existir un mecanismo complejo de regulación de $p27^{KIP1}$ y *E2F1*, en el que interviene c-Myc y ETV5, además de otras regiones del DNA que puedan favorecer el control transcripcional de estos genes, lo cual nuevamente resulta una limitante de los ensayos de luciferasa (Figura 22).

Otras razones por las que *p27^{KIP1}* y *E2F1* se sobreexpresan al silenciar parcialmente a *ETV5* en las células INS-1 (832/13), podrían ser un aumento en la estabilidad de los transcritos y/o proteínas mediante modificaciones post-transcripcionales y/o post-traduccionales. Esto se podría demostrar mediante la inhibición de la transcripción, estimulando las células con actinomicina D, o bien inhibiendo la traducción, estimulando las células con cicloheximida.

Finalmente, el silenciamiento parcial de *ETV5* disminuye la proliferación celular vía el aumento de los niveles de transcritos y de proteínas de *p27^{KIP1}* y *E2F1*. Además, los resultados señalan que *ETV5* no tiene una regulación transcripcional sobre el gen *p27^{KIP1}* y sugieren que puede tener una regulación transcripcional no directa sobre la expresión de *E2F1*. Por lo tanto, en ausencia de *ETV5* la sobreexpresión de *E2F1* conlleva a una sobreexpresión de *p27^{KIP1}*, proteína que provocará la inhibición del complejo ciclina/CDK y así, el paro del ciclo celular, disminuyendo la proliferación celular.

8.2. ETV5 regula la proliferación celular vía cambios morfológicos (remodelación del citoesqueleto y MET)

Por otra parte, *ETV5* pudiera estar regulando la proliferación celular en las células INS-1 (832/13), por medio de la remodelación del citoesqueleto, a nivel de los filamentos de actina y la modulación de cambios morfológicos a través de MET.

Nuestro modelo de estudio demostró que al silenciar parcialmente a *ETV5* existe una alteración en la disposición y distribución de F-actina. En una evidencia experimental similar, se ha descrito que en condiciones glucotóxicas, las células INS-1 (832/13) son incapaces de remodelar las redes de actina subcortical, impidiendo la secreción de insulina (Reshetnikova et al. 2000). Lo anterior sugiere que al disminuir a *ETV5*, se interrumpe la correcta polimerización de los filamentos de actina, lo cual impide la remodelación del citoesqueleto y esto a su vez, disminuye la capacidad secretora de insulina en las células INS-1 (832/13).

Por otra parte, se sabe que durante la mitosis debe de ocurrir la reorganización del citoesqueleto, a través de la polimerización de las redes de actina, para que ocurra una

correcta división celular (Heng y Koh 2010). Esto podría indicar que en las células INS-1 (832/13), al silenciar parcialmente a *ETV5*, existe una modificación en la polimerización de F-actina, lo cual impide la proliferación celular.

En un estudio con líneas celulares y cultivos primarios derivados de linaje hematopoyético, se reportó que cuando existe la mutación sin sentido 1294T en la proteína del síndrome Wiskott-Aldrich (WAS), se induce una mayor polimerización de F-actina, lo cual causa una disminución en la proliferación celular, así como un aumento en la apoptosis celular. También, se encontró que esto ocasiona un problema para que se complete la mitosis, causando que no se lleve a cabo la citocinesis y provocando que exista un incremento de células multinucleadas (Moulding et al. 2007). Por otro lado, se sabe que al estimular las células con jasplakinolida, un péptido cíclico, se promueve la polimerización y estabilización de F-actina, lo cual causa una disminución de la proliferación, aumento en la apoptosis y la aparición de células multinucleadas (Bubb et al. 1994; Heng y Koh 2010). Esto podría sugerir que al existir un aumento de la polimerización de F-actina en las células INS-1 (832/13), cuando se disminuye parcialmente a *ETV5*, también se pueda estar interrumpiendo el control dinámico de la actina, provocando una disminución en la proliferación de las células y, en consecuencia, disminuyendo la secreción de insulina. Aunado a lo anterior, estos resultados se pueden asociar a la disminución de la secreción de insulina en el modelo animal (Gutierrez-Aguilar et al. 2014), al existir un menor número de células beta.

Adicionalmente, se demostró que existe un cambio de fenotipo mesenquimal a epitelial entre las células controles y las silenciadas parcialmente de *ETV5*. Anteriormente, se ha reportado que los cambios en EMT a nivel de tejido pancreático, por activación de las vías Notch y Hh, intervienen en la diferenciación y en el establecimiento de la funcionalidad de las células pancreáticas (Beuran et al. 2015). Por otro lado, en un modelo de roedor, la inhibición de la vía Hh, promueve un fenotipo epitelial, lo cual provoca un retardo en el desarrollo del páncreas y en la cantidad de células beta (Lau y Hebrok 2010). Aunado a esto, se ha reportado que al inactivar a *ETV4* y *ETV5* se inhibe la vía Hh, en epitelio embrionario pulmonar de ratón, (Z. Zhang et al. 2009). Finalmente, la disminución de *ETV5* en la línea celular INS-1 (832/13), provoca un cambio de tipo epitelial, con una menor proliferación y una disfunción por disminución

de la secreción de insulina, lo cual podría deberse a la inhibición de la vía Hh y podrá ser explorado en estudios posteriores.

Así mismo, estas observaciones se correlacionan inversamente con lo que se observa en modelos de cáncer, donde *ETV5* se sobreexpresa y se evidencia un fenotipo mesenquimal (Alonso-Alconada et al. 2014; Colas et al. 2012; Meng et al. 2020; Puli et al. 2018). Por ejemplo, se ha estudiado que en un modelo de carcinoma endometrial, *ETV5* puede aumentar la expresión de *Zeb1* y *Slug* (marcadores de fenotipo mesenquimal), lo que reprime la expresión de E-cadherina (proteína de unión entre células y marcador de fenotipo epitelial) y aumenta la migración celular por remodelación del contacto entre las células y los sustratos (Colas et al. 2012). Lo anterior también se ha observado en diferentes líneas celulares de cáncer pancreático, en donde se ha evidenciado que un aumento de los marcadores de fenotipo mesenquimal Snail y Slug, se han correlacionado con una disminución en la expresión de la proteína de adhesión E-cadherina (Hotz et al. 2007). Lo anterior, aporta evidencia de que en diferentes carcinomas *ETV5* se sobreexpresa y la proteína E-cadherina se reduce, lo que indica la prevalencia de un fenotipo mesenquimal, que conlleva a una proliferación celular acelerada.

Por el contrario, en nuestro modelo de estudio, al silenciar parcialmente a *ETV5* en las células INS-1 (832/13), se pudo evidenciar un aumento del marcador E-cadherina y una disminución en la expresión del marcador vimentina. Esto coincide con la descripción de un fenotipo epitelial (Beuran et al. 2015) y justifica que la ausencia de *ETV5* provoca una disminución en la proliferación y migración celular, que a su vez puede correlacionarse con una menor secreción de insulina.

8.3. *ETV5* provoca cambios morfológicos (ultraestructura)

Previamente, nuestro grupo había publicado que *ETV5* se involucra en el proceso de secreción de insulina (Gutierrez-Aguilar et al. 2014).

Con los resultados presentados en este proyecto, se ha logrado reportar que la disminución de *ETV5* regula la proliferación celular por medio de un aumento del transcrito y proteína de *E2F1* y *p27^{KIP1}*. Además, también esa reducción de proliferación

se puede deber a la remodelación del citoesqueleto y a un cambio MET. Estos cambios en conjunto pueden explicar otro mecanismo por el cual ETV5 regula la secreción de insulina.

Sin embargo, con el fin de seguir estudiando los mecanismos por los cuales ETV5 ejerce su función sobre la secreción de insulina, en este proyecto también se estudiaron los cambios a nivel de ultraestructura en las células INS-1 (832/13). Se observó que en ausencia parcial de *ETV5* existe una acumulación de vesículas cercanas a la membrana. Previamente, se ha visto que *ETV5* se involucra en el proceso de exocitosis, regulando la expresión de genes del complejo SNARE (Gutierrez-Aguilar et al. 2014). Por lo tanto, esto sugiere que la acumulación de vesículas es consecuencia de una exocitosis defectuosa que lleva a la acumulación de vesículas de insulina, corroborando así la evidencia experimental de una menor secreción de insulina.

De acuerdo con lo anterior, otra forma en la que podría evidenciarse el efecto del silenciamiento de *ETV5* sobre la secreción de insulina y el tráfico vesicular, podría ser localizando y cuantificando la cantidad de las vesículas de insulina mediante inmuno-electromicroscopía; además de que se podría evaluar el tránsito de vesículas a través de las células, midiendo la relación de distancia entre las vesículas de insulina y la membrana citoplasmática. Por otra parte, se podría evaluar la expresión de posibles genes blanco de ETV5, relacionados con el transporte y reciclaje de vesículas.

También, se encontró que las células en donde se silenció parcialmente a *ETV5*, muestran un retículo endoplasmático de mayor tamaño respecto a las células control, el cual se encuentra distribuido de una forma característica entre el aparato de Golgi, como se describe en la literatura para la línea celular INS-1 (Karaskov et al. 2006). Esto podría indicar que, en ausencia de *ETV5* las células pudieran estar experimentando estrés de retículo endoplasmático. Respecto a esto se ha reportado que, en macrófagos el silenciamiento de *ETV5* conduce a la inducción de vías de señalización relacionadas a la respuesta de estrés de retículo (Hu et al. 2021). Lo que podría comprobarse en experimentos futuros como perspectivas de este trabajo.

Por lo tanto, la ausencia parcial de *ETV5* en las células INS-1 (832/13), sugiere que a nivel de ultraestructura, la disminución en la secreción de insulina, previamente

reportada (Gutierrez-Aguilar et al. 2014), se debe a un impedimento en la exocitosis, lo que conlleva a un acúmulo de vesículas de insulina. También, esta disminución de *ETV5*, es capaz de generar cambios en la morfología de algunos organelos, que podrían repercutir en la proliferación de las células.

Además, los cambios morfológicos, tanto de citoesqueleto (F-actina) y de fenotipo epitelial que ocasiona la MET, provocan una reducción de la proliferación celular y en consecuencia una disminución en la insulina secretada, contribuyendo al acúmulo de vesículas.

9. Resumen de resultados

Al silenciar parcialmente a *ETV5* en la línea celular INS-1 (832/13), aumenta la expresión a nivel de transcrito, así como el de proteína de *p27^{KIP1}*, lo cual podría ocasionar una disminución de la proliferación celular. Sin embargo, no se comprobó que este aumento en la expresión de *p27^{KIP1}* suceda por regulación transcripcional directa de *ETV5*.

La ausencia parcial de *ETV5* inhibe transcripcionalmente a *E2F1* en la región promotora de -1220 a -24 pb, aunque estos resultados no explican la sobreexpresión de este gen y su función en la regulación de la proliferación celular en nuestro modelo de estudio.

El silenciamiento parcial de *ETV5* provoca en las células INS-1 (832/13) una remodelación del citoesqueleto, alterando la disposición y aumentando la polimerización de los filamentos de actina.

La disminución de *ETV5* en las células INS-1 (832/13) provoca la transición del fenotipo mesenquimal a epitelial, disminuyendo la cantidad de vimentina y aumentando la cantidad de E-cadherina.

La ausencia parcial de *ETV5* provoca cambios morfológicos en la línea celular INS-1 (832/13) a nivel de ultraestructura, lo que podría ocasionar cambios en la proliferación.

Por lo tanto, *ETV5* regula la proliferación de las células INS-1 (832/13) a nivel de ciclo celular, por remodelación del citoesqueleto y por la inducción de MET (Figura 23).

10. Conclusión

En este trabajo, se elucidó que al silenciar parcialmente a *ETV5* en las células INS-1 (832/13), aumentó la expresión de *p27^{Kip1}* y *E2F1*; sin embargo, la inhibición de la proliferación celular no se debe a la regulación transcripcional de *ETV5* sobre los promotores de estos genes. Por otra parte, se probó que *ETV5* provoca cambios morfológicos (en citoesqueleto, en la transición del fenotipo mesenquimal a epitelial y en la ultraestructura celular) que regulan la proliferación celular.

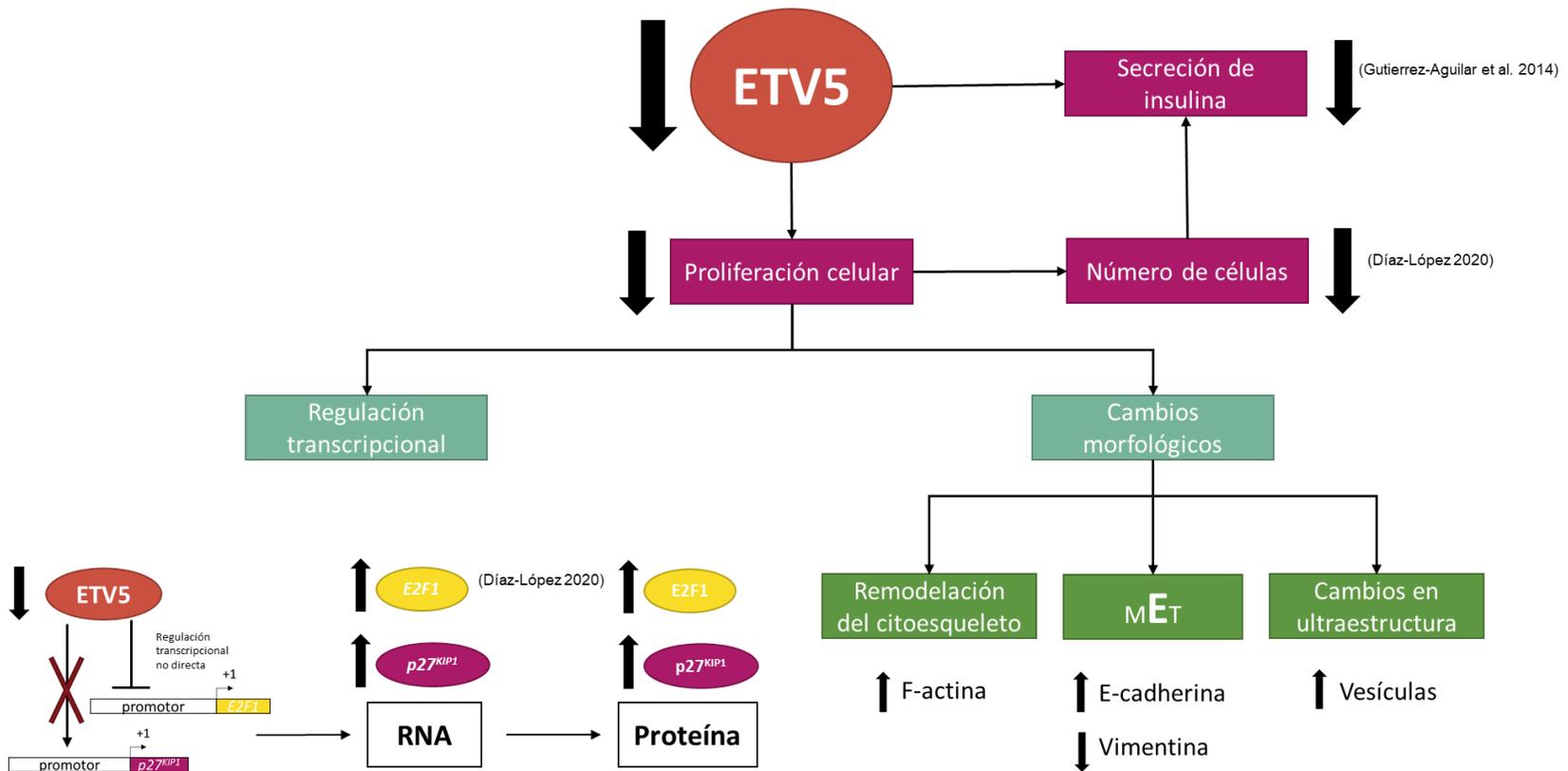


Figura 23. Resumen del estudio de ETV5 en la regulación transcripcional de *E2F1* y *p27^{KIP1}*, y cambios morfológicos de la línea celular secretora de insulina INS 1 (832/13). Al silenciar parcialmente a *ETV5* en las células INS-1 (832/13), se disminuye la secreción de insulina. Además, se disminuye el número de células y la proliferación celular, otra razón por la que hay menor secreción de insulina. En este trabajo, se encontró evidencia de que la proliferación disminuyó al silenciar parcialmente a *ETV5*, ya que se aumenta a nivel de transcrito y proteína a *E2F1* y *p27^{KIP1}*; sin embargo, la regulación transcripcional no es directa. Además, de que al disminuir a *ETV5* se provocan cambios morfológicos, a nivel de citoesqueleto, mediante un cambio de fenotipo de mesenquimal a epitelial y por cambios en la ultraestructura de las células.

11. Perspectivas

Silenciar a *ETV5* y *E2F1* simultáneamente en la línea celular INS-1 (832/13), para poder comprobar la actividad transcripcional de *E2F1*.

Probar la posible unión y regulación transcripcional de *ETV5* sobre los promotores de *E2F1* y *p27^{KIP1}* mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina.

Probar si *ETV5* tiene una regulación post-transcripcional sobre los genes *E2F1* y *p27^{KIP1}*, mediante ensayos de estimulación con actinomicina D (inhibidor transcripcional)

Probar si *ETV5* regula a nivel de traducción o post-traducciona a las proteínas de *E2F1* y *p27^{KIP1}*, mediante ensayos de estimulación con cicloheximida (inhibidor traducciona)

Buscar otros genes inhibidores del ciclo celular que *ETV5* pudiera regular transcripcionalmente (*CDKN1A/p21*, *PAK3* (*p21 activated kinase 3*), *CDKN1C/p57*).

Evaluar el tráfico vesicular al silenciar a *ETV5* en las células INS-1 (832/13), midiendo la relación de distancia entre vesículas y membrana citoplasmática.

Evidenciar el transporte vesicular de insulina a través de inmunoelectromicroscopía.

Analizar la expresión de genes de transporte y reciclaje de vesículas asociadas al silenciamiento de *ETV5* en las células INS-1 (832/13).

Evaluar las vías de señalización relacionadas a estrés de retículo en las que *ETV5* pudiera influir en las células beta.

12. Anexos

12.1. Gel separador de poliacrilamida 14%

Agua destilada	2.34 mL
1.5 M Tris-HCL pH 8.8	2.1 mL
SDS 10 %	85 µL
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	3.92 mL
Persulfato de amonio 20 %	42.5 µL
TEMED	8.5 µL

12.2. Gel apilador de poliacrilamida 5%

Agua destilada	2.4 mL
1.5 M Tris-HCL pH 8.8	443.7 µL
SDS 10 %	35 µL
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	3.92 mL
Persulfato de amonio 20 %	42.5 µL
TEMED	8.5 µL

12.3. Amortiguador de electrodos (pH= 8.3)

Trizma base	3.025 g
Glicina	14.44 g
Metanol 100%	200 mL
SDS 1%	10 mL
Agua destilada	Aforar a 1L

12.4. Amortiguador para el cargado de proteínas (pH= 6.8)

Trizma base	0.63 g
Glicerol 100%	8.0 mL
SDS 8%	1.6 g
Agua destilada	Aforar a 20.0 mL

12.5. Amortiguador de transferencia 1x

250 mM Trizma base	3.035 g
Glicina	14.44 g
Metanol 100%	200 mL
Agua destilada	Aforar a 1L

12.6. Amortiguador de fosfatos (PBS) 1x (pH= 7.4)

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ * 7H ₂ O	1.44 g
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	0.2 g
Agua destilada	Aforar a 1L

12.7. Amortiguador de bloqueo para membranas PVDF

Leche en polvo	1.0 g
PBS 1x	20 mL
Tween	240 µL

12.8. Amortiguador para el cargado de DNA 10x

Glicerol	50%
Azul de bromofenol	0.25%
Amortiguador TAE (Tris-Acetato-EDTA)	10x
Syber gold (Thermo Scientific, S11494)	diluir 1:100

12.9. Gel de agarosa 1% (100 mL)

Agarosa	0.1 g
Buffer TAE 1x	100 mL

Disolver calentando por intervalos de 10 segundos en el microondas, hasta disolver por completo la agarosa.

12.10. Solución de CaCl₂ 100 mM (100mL)

CaCl ₂	1.110 g
Glicerol	15 mL
Agua	c.b.p. 100 mL

12.11. Solución de CaCl₂ 60 mM (5 mL)

CaCl ₂	33.3 mg
Glicerol	0.75 mL
Agua	c.b.p. 5 mL

12.12. Stock Mg²⁺ 2M

MgCl ₂ * 6H ₂ O	20.33 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O	24.65 g
Agua destilada	Aforar a 100 mL

Esterilizar por filtración.

12.13. Medio de cultivo caldo superóptimo de represión catabólica (SOC)

Triptona	2.0 g
Extracto de levadura	0.5 g
NaCl 1 M	1.0 mL
KCl 1M	0.25 mL
Stock Mg ²⁺ 2M (filtrado por esterilización)	1.0 mL
Glucosa 2M (filtrada por esterilización)	1.0 mL

Disolver la triptona, el extracto de levadura, el cloruro de sodio y el cloruro de potasio a 97 mL de agua destilada. Esterilizar por autoclave y posteriormente, añadir el stock 2M de Mg²⁺ con la glucosa 2M. Llevar a un volumen final de 100 mL con agua destilada estéril. El pH debe ser ajustado a 7.0.

12.14. Medio de cultivo agar Luria Broth (LB)

Agar LB (L3027-250G) 20 g

Agua destilada Aforar a 1L

Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min.

12.15. Medio de cultivo caldo Luria Broth (LB)

Caldo LB (L3022-250G) 20 g

Agua destilada Aforar a 1L

Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min

12.16. Fijador de Karnovsky modificado

Formaldehído 10 %

Glutaraldehído 2.5%

Diluir en PBS 1x pH = 7.2

13. Referencias

Aguilar, Victor, and Lluís Fajas. 2010. "Cycling through Metabolism." *EMBO Molecular Medicine* 2 (9): 338–48. <https://doi.org/10.1002/emmm.201000089>.

Alonso-Alconada, Lorena, Nuria Eritja, Laura Muínelo-Romay, Jorge Barbazan, Rafael Lopez-Lopez, Xavier Matias-Guiu, Antonio Gil-Moreno, Xavier Dolcet, and Miguel Abal. 2014. "ETV5 Transcription Program Links BDNF and Promotion of EMT at Invasive Front of Endometrial Carcinomas." *Carcinogenesis* 35 (12): 2679–86. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu198>.

Andersson, Robin, Albin Sandelin, and Charles G. Danko. 2015. "A Unified Architecture of Transcriptional Regulatory Elements." *Trends in Genetics* 31 (8): 426–33. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.05.007>.

Apelqvist, Åsa, Hao Li, Lukas Sommer, Paul Beatus, David J. Anderson, Tasuku Honjo, Martin Hrabě De Angelis, Urban Lendahl, and Helena Edlund. 1999. "Notch Signalling Controls Pancreatic Cell Differentiation." *Nature* 400 (6747): 877–81. <https://doi.org/10.1038/23716>.

Bertoli, Cosetta, Jan M. Skotheim, and Robertus A.M. De Bruin. 2013. "Control of Cell Cycle Transcription during G1 and S Phases." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (8): 518–28. <https://doi.org/10.1038/nrm3629>.

Besson, Arnaud, Steven F. Dowdy, and James M. Roberts. 2008. "CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond." *Developmental Cell* 14 (2): 159–69. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.01.013>.

Beuran, Mircea, Ionut Negoii, Sorin Paun, Adriana Daniela Ion, Coralia Bleotu, Ruxandra Irina Negoii, and Sorin Hostiuc. 2015. "The Epithelial to Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer: A Systematic Review." *Pancreatology* 15 (3): 217–25. <https://doi.org/10.1016/j.pan.2015.02.011>.

Black, Adrian R., and Jane Azizkhan-Clifford. 1999. "Regulation of E2F: A Family of Transcription Factors Involved in Proliferation Control." *Gene* 237 (2): 281–302. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00305-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00305-4).

Böni-Schnetzler, Marianne, Stéphanie P. Häuselmann, Elise Dalmas, Daniel T. Meier, Constanze Thienel, Shuyang Traub, Friederike Schulze, et al. 2018. "β Cell-Specific Deletion of the IL-1 Receptor Antagonist Impairs β Cell Proliferation and Insulin Secretion." *Cell Reports* 22 (7): 1774–86. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.063>.

Bubb, Michael R., Adrian M.J. Senderowicz, Edward A. Sausville, Kimberly L.K. Duncan, and Edward D. Korn. 1994. "Jasplakinolide, a Cytotoxic Natural Product, Induces Actin Polymerization and Competitively Inhibits the Binding of Phalloidin to F-Actin." *Journal of Biological Chemistry* 269 (21): 14869–71. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)36545-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)36545-6).

Chazotte, Brad. 2010. "Labeling Cytoskeletal F-Actin with Rhodamine Phalloidin or Fluorescein Phalloidin for Imaging." *Cold Spring Harbor Protocols* 5 (5). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4947>.

Cheng, Xi, Zhijian Jin, Xiaopin Ji, Xiaonan Shen, Haoran Feng, William Morgenlander, Baochi Ou, et al. 2019. "ETS Variant 5 Promotes Colorectal Cancer Angiogenesis by Targeting Platelet-Derived Growth Factor BB." *International Journal of Cancer* 145 (1): 179–91. <https://doi.org/10.1002/ijc.32071>.

Colas, E., L. Muinelo-Romay, L. Alonso-Alconada, M. Llaurodo, M. Monge, J. Barbazan, M. Gonzalez, et al. 2012. "ETV5 Cooperates with LPP as a Sensor of Extracellular Signals and Promotes EMT in Endometrial Carcinomas." *Oncogene* 31 (45): 4778–88. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.632>.

Cook, Jacob P., and Jeanette G. Matson. 2017. "Cell Cycle Proliferation Decisions: The Impact of Single Cell Analyses." *The FEBS Journal* 284 (3): 362–75. <https://doi.org/10.1111/febs.13898>.Cell.

Dana, Hassan, Ghanbar Mahmoodi Chalbatani, Habibollah Mahmoodzadeh, Rezvan Karimloo, Omid Rezaiean, Amirreza Moradzadeh, Narges Mehmandoost, et al. 2017. "Molecular Mechanisms and Biological Functions of SiRNA." *International Journal of Biomedical Science: IJBS* 13 (2): 48–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28824341><http://www.pubmedcentral.ni>

h.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5542916.

Denechaud, Pierre Damien, Lluís Fajas, and Albert Giralt. 2017. "E2F1, a Novel Regulator of Metabolism." *Frontiers in Endocrinology* 8 (NOV): 1–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00311>.

DeSalvo, Joanna, Yuguang Ban, Luyuan Li, Xiaodian Sun, Zhijie Jiang, Darcy A. Kerr, Mahsa Khanlari, et al. 2021. "ETV4 and ETV5 Drive Synovial Sarcoma through Cell Cycle and DUX4 Embryonic Pathway Control." *Journal of Clinical Investigation* 131 (13): 1–18. <https://doi.org/10.1172/JCI141908>.

Díaz-López, Y.E. 2020. "IMPLICACIÓN DE ETV5 EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR DE LAS CÉLULAS INS-1 (832/13) Y SUS GENES BLANCO." *Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Carrera Química Farmacéutico Biológica.*

Du, William W., Weining Yang, Elizabeth Liu, Zhenguo Yang, Preet Dhaliwal, and Burton B. Yang. 2016. "Foxo3 Circular RNA Retards Cell Cycle Progression via Forming Ternary Complexes with P21 and CDK2." *Nucleic Acids Research* 44 (6): 2846–58. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw027>.

Duan, Yinong, Lei Lyu, Dandan Zhu, Jianxin Wang, Jinling Chen, Liuting Chen, Chunzhao Yang, and Xiaolei Sun. 2017. "Recombinant SjP40 Protein Enhances P27 Promoter Expression in Hepatic Stellate Cells via an E2F1-Dependent Mechanism." *Oncotarget* 8 (25): 40705–12. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17248>.

Dubey, Kashyap Kumar, Punit Kumar, Nikolaos E. Labrou, and Pratyosh Shukla. 2017. "Biotherapeutic Potential and Mechanisms of Action of Colchicine." *Critical Reviews in Biotechnology* 37 (8): 1038–47. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1303804>.

Dugina, V. B., G. S. Shagieva, and P. B. Kopnin. 2019. "Biological Role of Actin Isoforms in Mammalian Cells." *Biochemistry (Moscow)* 84 (6): 583–92. <https://doi.org/10.1134/S0006297919060014>.

Eo, Jinwon, Haengseok Song, and Hyunjung Jade Lim. 2012. "Etv5, a Transcription Factor with Versatile Functions in Male Reproduction." *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* 39 (2): 41–45. <https://doi.org/10.5653/cerm.2012.39.2.41>.

Feitelson, Mark A., Alla Arzumanyan, Rob J. Kulathinal, Stacy W. Blain, Randall F. Holcombe, Jamal Mahajna, Maria Marino, et al. 2016. "Sustained Proliferation in Cancer: Therapeutic Targets." *Seminars Cancer Biology* 35: 25–54. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.006>. Sustained.

Feng, Haoran, Kun Liu, Xiaopin Ji, Yi Peng, You Li, Tao Zhang, Changgang Wang, et al. 2019. "ETV5 Promotes Angiogenesis and Accelerates Bevacizumab Resistance in Colorectal Cancer by Transcriptionally Activating VEGFA 1 . Department of General Surgery , Ruijin Hospital North , Shanghai Jiao Tong University School Financial Support : National Natu."

Georgakopoulos-Soares, Ilias, Dionysios V. Chartoumpakis, Venetsana Kyriazopoulou, and Apostolos Zaravinos. 2020. "EMT Factors and Metabolic Pathways in Cancer." *Frontiers in Oncology* 10 (April): 1–20. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00499>.

Giacinti, C., and A. Giordano. 2006. "RB and Cell Cycle Progression." *Oncogene* 25 (38): 5220–27. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209615>.

Gopinath, Sreelatha, Kiranmai Alapati, Rama Rao Malla, Christopher S. Gondi, Sanjeeva Mohanam, Dzung H. Dinh, and Jasti S. Rao. 2011. "Mechanism of P27 Upregulation Induced by Downregulation of Cathepsin B and UPAR in Glioma." *Molecular Oncology* 5 (5): 426–37. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2011.07.004>.

Gutierrez-Aguilar, Ruth, Dong Hoon Kim, Marina Casimir, Xiao Qing Dai, Paul T. Pfluger, Jongsun Park, April Haller, et al. 2014. "The Role of the Transcription Factor ETV5 in Insulin Exocytosis." *Diabetologia* 57 (2): 383–91. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-3096-5>.

Heng, Yi Wen, and Cheng Gee Koh. 2010. "Actin Cytoskeleton Dynamics and the

Cell Division Cycle.” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 42 (10): 1622–33. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.04.007>.

Hotz, Birgit, Marco Arndt, Sonja Dullat, Sarah Bhargava, Heinz J. Buhr, and Hubert G. Hotz. 2007. “Epithelial to Mesenchymal Transition: Expression of the Regulators Snail, Slug, and Twist in Pancreatic Cancer.” *Clinical Cancer Research* 13 (16): 4769–76. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2926>.

Hu, Ren Dong, Wen Zhang, Liang Li, Zu Qi Zuo, Min Ma, Jin Fen Ma, Ting Ting Yin, et al. 2021. “Chromatin Accessibility Analysis Identifies the Transcription Factor ETV5 as a Suppressor of Adipose Tissue Macrophage Activation in Obesity.” *Cell Death and Disease* 12 (11). <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04308-0>.

I. Evan, Gerard, and Karen H. Vousden. 2001. “Proliferation, Cell Cycle and Apoptosis in Cancer.” *Nature* 411 (May): 342–48. <http://www.nature.com/nature/journal/v411/n6835/pdf/411342a0.pdf>.

Ivanchuk, Stacey M., James T. Rutka, Joseph M. Piepmeier, Andrew T. Parsa, and Nicholas Boulis. 2004. “The Cell Cycle: Accelerators, Brakes, and Checkpoints.” *Neurosurgery* 54 (3): 692–700. <https://doi.org/10.1227/01.NEU.0000109534.28063.5D>.

Jain, Rajul K., David S. Hong, Aung Naing, Jennifer Wheler, Thorunn Helgason, Nai Yi Shi, Yash Gad, and Razelle Kurzrock. 2015. “Novel Phase I Study Combining G1 Phase, S Phase, and G2/M Phase Cell Cycle Inhibitors in Patients with Advanced Malignancies.” *Cell Cycle* 14 (21): 3434–40. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1090065>.

Jones, Matthew C., Junzhe Zha, and Martin J. Humphries. 2019. “Connections between the Cell Cycle, Cell Adhesion and the Cytoskeleton.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 374 (1779): 1–10. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0227>.

Kalluri, R, and R A Weinberg. 2009. “The Basics of Epithelial-Mesenchymal

Transition.” *The Journal of Clinical Investigation* 119 (6): 1420–1428. <https://doi.org/10.1172/JCI39104>.

Karaskov, Elizabeth, Cameron Scott, Liling Zhang, Tracy Teodoro, Mariella Ravazzola, and Allen Volchuk. 2006. “Chronic Palmitate but Not Oleate Exposure Induces Endoplasmic Reticulum Stress, Which May Contribute to INS-1 Pancreatic β -Cell Apoptosis.” *Endocrinology* 147 (7): 3398–3407. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1494>.

Lara-Gonzalez, Pablo, Frederick G Westhorpe, and Stephen S Taylor. 2012. “Review- The Spindle Assembly Checkpoint (Higher Eukaryotes).” *Current Biology* 22 (22): R966–80. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.10.006>.

Lau, Janet, and Matthias Hebrok. 2010. “Hedgehog Signaling in Pancreas Epithelium Regulates Embryonic Organ Formation and Adult β -Cell Function.” *Diabetes* 59 (5): 1211–21. <https://doi.org/10.2337/db09-0914>.

Liu, Ching Yi, Hsi Hui Lin, Ming Jer Tang, and Yang Kao Wang. 2015. “Vimentin Contributes to Epithelial-Mesenchymal Transition Ancer Cell Mechanics by Mediating Cytoskeletal Organization and Focal Adhesion Maturation.” *Oncotarget* 6 (18): 15966–83. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3862>.

Liu, Yang, and Yuanyuan Zhang. 2019. “ETV5 Is Essential for Neuronal Differentiation of Human Neural Progenitor Cells by Repressing NEUROG2 Expression.” *Stem Cell Reviews and Reports* 15 (5): 703–16. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09904-4>.

Luo, Gang, Dong Liu, Chao Huang, Miao Wang, Xingyuan Xiao, Fuqing Zeng, Liang Wang, and Guosong Jiang. 2017. “LncRNA GAS5 Inhibits Cellular Proliferation by Targeting P27Kip1.” *Molecular Cancer Research* 15 (7): 789–99. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0331>.

Martino, Erica di, Olivia Alder, Carolyn D. Hurst, and Margaret A. Knowles. 2019. “ETV5 Links the FGFR3 and Hippo Signalling Pathways in Bladder Cancer.” *Scientific Reports* 9 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36456-3>.

Meng, Dongdong, Zhifu Li, Xiaojun Ma, Lina Wu, Lijun Fu, and Guijun Qin. 2020. "ETV5 Overexpression Contributes to Tumor Growth and Progression of Thyroid Cancer through PIK3CA." *Life Sciences* 253 (1): 117693. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117693>.

Moulding, Dale A., Michael P. Blundell, David G. Spiller, Michael R.H. White, Giles O. Cory, Yolanda Calle, Helena Kempinski, et al. 2007. "Unregulated Actin Polymerization by WASp Causes Defects of Mitosis and Cytokinesis in X-Linked Neutropenia." *Journal of Experimental Medicine* 204 (9): 2213–24. <https://doi.org/10.1084/jem.20062324>.

Oakes, Vanessa, Weili Wang, Brittney Harrington, Won Jae Lee, Heather Beamish, Kee Ming Chia, Alex Pinder, et al. 2014. "Cyclin A/Cdk2 Regulates Cdh1 and Claspin during Late S/G2 Phase of the Cell Cycle." *Cell Cycle* 13 (20): 3302–11. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.949111>.

Oikawa, Tsuneyuki, and Toshiyuki Yamada. 2003. "Molecular Biology of the Ets Family of Transcription Factors." *Gene*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)01156-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)01156-3).

Pastushenko, Ievgenia, and Cédric Blanpain. 2019. "EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis." *Trends in Cell Biology* 29 (3): 212–26. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.001>.

Pei, Duanqing, Xiaodong Shu, Ama Gassama-Diagne, and Jean Paul Thiery. 2019. "Mesenchymal–Epithelial Transition in Development and Reprogramming." *Nature Cell Biology* 21 (1): 44–53. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0195-z>.

Petrova, Yuliya I., Leslyann Schecterson, and Barry M. Gumbiner. 2016. "Roles for E-Cadherin Cell Surface Regulation in Cancer." *Molecular Biology of the Cell* 27 (21): 3233–44. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-01-0058>.

Puli, Oorvashi Roy, Brian P. Danysh, Elena McBeath, Deepankar K. Sinha, Nguyet M. Hoang, Reid T. Powell, Heather E. Danysh, Maria E. Cabanillas, Gilbert J. Cote, and Marie Claude Hofmann. 2018. "The Transcription Factor ETV5 Mediates

BRAFV600E-Induced Proliferation and TWIST1 Expression in Papillary Thyroid Cancer Cells.” *Neoplasia (United States)* 20 (11): 1121–34. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.09.003>.

Quinault, Aurore, Blandine Gausseres, Danielle Bailbe, Nella Chebbah, Bernard Portha, Jamileh Movassat, and Cecile Tourrel-Cuzin. 2016. “Disrupted Dynamics of F-Actin and Insulin Granule Fusion in INS-1 832/13 Beta-Cells Exposed to Glucotoxicity: Partial Restoration by Glucagon-like Peptide 1.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1862 (8): 1401–11. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.04.007>.

Reshetnikova, Galina, Rita Barkan, Boris Popov, Nikolay Nikolsky, and Long Sheng Chang. 2000. “Disruption of the Actin Cytoskeleton Leads to Inhibition of Mitogen-Induced Cyclin E Expression, Cdk2 Phosphorylation, and Nuclear Accumulation of the Retinoblastoma Protein-Related P107 Protein.” *Experimental Cell Research* 259 (1): 35–53. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4966>.

Sangphil Oh, Sook Shin, and Ralf Janknecht. 2012. “ETV1, 4 and 5: An Oncogenic Subfamily of ETS Transcription Factors.” *Biochim Biophys Acta*. 23 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.

Sizemore, Gina M., Jason R. Pitarresi, Subhasree Balakrishnan, and Michael C. Ostrowski. 2017. “The ETS Family of Oncogenic Transcription Factors in Solid Tumours.” *Nature Reviews Cancer* 17 (6): 337–51. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.20>.

Smith, Hannah L., Harriet Southgate, Deborah A. Tweddle, and Nicola J. Curtin. 2020. “DNA Damage Checkpoint Kinases in Cancer.” *Expert Reviews in Molecular Medicine* 22. <https://doi.org/10.1017/erm.2020.3>.

Szabat, Marta, Melissa M. Page, Evgeniy Panzhinskiy, Søs Skovsø, Majid Mojibian, Juan Fernandez-Tajes, Jennifer E. Bruin, et al. 2016. “Reduced Insulin Production Relieves Endoplasmic Reticulum Stress and Induces β Cell Proliferation.” *Cell Metabolism* 23 (1): 179–93. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.10.016>.

Tizro, Parastou, Cecilia Choi, and Negar Khanlou. 2019. "Sample Preparation for Transmission Electron Microscopy." *Methods in Molecular Biology* 1897: 417–24. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_33.

Wang, Chuangui, Xinghua Hou, Subhra Mohapatra, Yihong Ma, W. Douglas Cress, W. Jack Pledger, and Jiandong Chen. 2005. "Activation of P27Kip1 Expression by E2F1: A Negative Feedback Mechanism." *Journal of Biological Chemistry* 280 (13): 12339–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400536200>.

Wenzel, Elizabeth S., and Amareshwar T.K. Singh. 2018. "Cell-Cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer." *In Vivo* 32 (1): 1–5. <https://doi.org/10.21873/invivo.11197>.

Yang, William, Jian Shen, Min Wu, Marcello Arsura, Mark FitzGerald, Zalman Suldan, Dong W. Kim, et al. 2001. "Repression of Transcription of the P27Kip1 Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Gene by c-Myc." *Oncogene* 20 (14): 1688–1702. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204245>.

Yilmaz, Mahmut, and Gerhard Christofori. 2009. "EMT, the Cytoskeleton, and Cancer Cell Invasion." *Cancer and Metastasis Reviews* 28 (1–2): 15–33. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9169-0>.

Zhang, Fan, Shuwen Wang, and Jiyue Zhu. 2020. "ETS Variant Transcription Factor 5 and C-Myc Cooperate in Derepressing the Human Telomerase Gene Promoter via Composite ETS/E-Box Motifs." *Journal of Biological Chemistry* 295 (29): 10062–75. <https://doi.org/10.1074/jbc.ra119.012130>.

Zhang, Zhen, Jamie M Verheyden, John A Hassell, and Xin Sun. 2009. "FGF-Regulated Etv Genes Are Essential for Repressing Shh Expression in Mouse Limb Buds." *Developmental Cell* 16 (4): 607–13. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.02.008>.