



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

XAF1 es regulado a nivel transcripcional por NF- κ B

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A:

Lorena Pinedo de la Torre

**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Jorge Meléndez Zajgla
2010**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Medicina Genómica como proyecto de tesis de licenciatura. La dirección del mismo estuvo a cargo del Dr. Jorge Meléndez Zajgla, siendo la parte experimental bajo la tutoría de Q.F.B. Gustavo Ulises Martínez Ruíz .

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Pinedo
de la Torre
Lorena
56 88 99 69
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
302659861

2. Datos del tutor

Dr.
Jorge
Meléndez
Zajgla

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Vilma
Maldonado
Lagunas

4. Datos del sinodal 2

Dra.
María de Lourdes
Segura
Valdez

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Gisela
Ceballos
Cancino

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Patricia
Mendoza
Lorenzo

7. Datos del trabajo escrito

Título: XAF1 es regulado a nivel transcripcional por NF- κ B

No. de páginas: 54

Año: 2010

A mis padres

ÍNDICE

	página
I. Introducción	4.
1. Cáncer.....	4.
2. Apoptosis.....	5.
2.1 Características.....	6.
2.2 Caspasas.....	6.
2.3 Vías de señalización apoptóticas.....	7.
2.4 Apoptosis en cáncer.....	8.
3. IAP's.....	8.
3.1 Descripción.....	8.
3.2 Características de la familia de las IAPs.....	9.
3.3 Implicación de las IAPs en cáncer.....	9.
3.4 XIAP	9.
4. XAF1.....	11.
4.1 Descripción.....	11.
4.2 Características.....	11.
4.3 XAF1 como candidato a gen supresor de tumores.....	12.
4.4 Regulación de la transcripción de XAF1.....	13.
4.4.1 Regulación transcripcional de genes.....	13.
4.4.2 Regulación negativa de XAF1.....	14.
4.4.3 Regulación positiva de XAF1.....	15.
5. NF- κ B.....	16.
5.1 NF- κ B como factor de transcripción.....	16.
5.2 Vía canónica de NF- κ B.....	16.
II. Justificación	18.
III. Objetivos	18.
1. Objetivo general.....	18.
2. Objetivos particulares.....	18.
IV. Métodos	19.
1. Análisis <i>in silico</i> de los posibles sitios activos del promotor de XAF1.....	19.
2. Extracción de DNA.....	19.
3. PCR.....	20.
4. Purificación de los productos de PCR.....	21.
5. Clonación en el vector PTZ57/RT.....	22.
5.1 Transformación.....	23.
5.2 Extracción de los plásmidos: pTZ57RT/XAF600 y pTZ57RT/XAF1200.....	23.
5.3 Restricción enzimática de los plásmidos: pTZ57RT/XAF600 y pTZ57RT/XAF1200.....	24.
6. Clonación en el vector pSEAP2-basic.....	25.
6.1 Amplificación y extracción del vector pSEAP2-basic.....	25.
6.2 Ligación pSEAP2-basic/XAF1.....	26.
6.3 Extracción de plásmidos y digestión.....	26.
6.4 Secuenciación y análisis del fragmento clonado.....	27.
6.5 Amplificación y extracción por Kit para transfección.....	27.

V. Resultados	28
1. Ensayo <i>in silico</i>	28.
2. Amplificación del promotor.....	34.
3. Clonación en PTZ57/RT.....	35.
4. Identificación del plásmido pSEAP2-basic.....	37.
5. Identificación del plásmido pSEAP2-control.....	37.
6. Digestiones de plásmidos pSEAP2-basic y pSEAP2-control.....	38.
7. Apertura del vector pSEAP2-basic.....	39.
8. Clonación de la secuencia promotora de XAF 600 en el vector pSEAP2-basic.....	40.
9. Clonación de la secuencia promotora de XAF 1200 en el vector pSEAP2-basic.	41.
10. Secuenciación de los fragmentos del promotor clonados en pSEAP2-basic.....	42.
VI. Discusión	46.
VII. Conclusiones	51.
VIII. Perspectivas	52.
IX. Glosario	53.
X. Bibliografía	54.

I. INTRODUCCIÓN

1. Cáncer

El cáncer constituye un problema de salud pública en virtud de la enorme pérdida de vidas y recursos económicos, tanto a nivel nacional como internacional. De acuerdo con las estadísticas, se estima que cuatro de cada diez mexicanos desarrollarán alguna forma de cáncer y uno de cada cinco morirá por esta causa, de aquí la importancia de estudiar los mecanismos que regulan esta patología ¹.

El cáncer es una enfermedad multifactorial cuyo origen está dado por el efecto de factores denominados carcinógenos ¹. Un carcinógeno es un agente que contribuye a la formación de un tumor ², estos pueden ser exógenos (agentes físicos, químicos y biológicos) o endógenos (constitución genética), ambos pueden actuar en conjunto y provocar modificaciones en el genoma ¹.

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por una alteración del equilibrio entre la proliferación y los mecanismos normales de la muerte celular. Tales alteraciones eventualmente conducen a la invasión de tejidos adyacentes, y en la mayoría de los casos, a la diseminación hacia sitios distantes lo que genera tumores secundarios. Por lo regular, este trastorno conlleva a la muerte debido al deterioro de órganos vitales ¹.

En general, se han descrito varios rasgos o capacidades adquiridas por la mayoría, o posiblemente, por todos los tipos de cáncer dadas las características moleculares, bioquímicas y celulares que comparten ³ (**Fig 1**). Las cuales son: adquisición de autonomía respecto a señales de crecimiento, evasión de señales inhibitorias de crecimiento, evasión de apoptosis, potencial replicativo ilimitado, formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) y habilidad de invadir tejido adyacente con eventual metástasis ³. Recientemente se ha identificado a la inflamación crónica como otro mecanismo dado que es un componente clave en el microambiente del tumor ⁴.

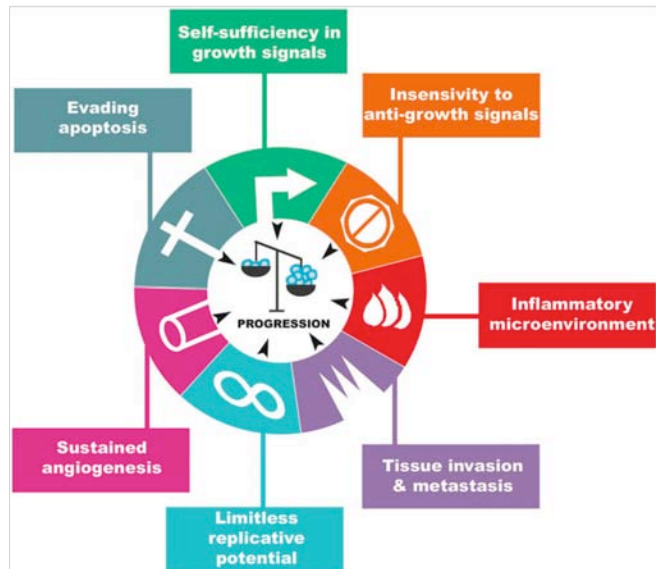


Figura 1. Características adquiridas en la progresión del cáncer (Colotta et al. 2009; modificado de Hanahan D. , Weinberg R., 2000)

Algunos genes que intervienen en el origen y desarrollo de los tumores se han clasificado por su función como oncogenes y supresores de tumores, los cuales ejercen una acción positiva sobre el desarrollo tumoral; y genes supresores de tumores, mientras que los segundos son la contraparte negativa. Un oncogén es un gen alterado cuyo producto puede actuar de forma dominante para transformar una célula normal en una célula cancerosa. Un proto-oncogén es un gen normal que puede adquirir la habilidad de funcionar como un oncogén después de que el DNA ha sido dañado. Por ejemplo el proto-oncogén *RAS*, involucrado en la transducción de señales, requiere de una mutación puntual para convertirse de gen normal en un potente oncogén, favoreciendo el proceso carcinogénico ².

En contraste, un gen supresor de tumores es un gen cuya inactivación o pérdida de función incrementa la susceptibilidad a desarrollar cáncer. Un ejemplo, es *TP53*, un gen involucrado en el arresto del ciclo celular en caso de daño al DNA, y capaz de promover señales para inducir la muerte celular si el daño al DNA no pueda ser reparado. La pérdida de función de este gen promueve la proliferación de células aberrantes ^{1,2}.

2. Apoptosis

2.1 Características

En organismos sanos, las células normalmente mueren típicamente vía apoptosis, un tipo de muerte celular programada ⁵. La apoptosis es un proceso altamente regulado y muy conservado evolutivamente, que ocurre frecuentemente en organismos multicelulares ². En diversos estudios se ha observado que dicho proceso opera en todos los animales estudiados hasta ahora, incluyendo cnidaria, nemátodos, insectos, anfibios, aves y mamíferos ⁶. Este tipo de muerte celular es fundamental en eventos tales como el desarrollo y la homeostasis tisular así como en el mantenimiento de la integridad de organismos multicelulares. Es por ésto que la desregulación de los mecanismos que controlan la apoptosis conlleva a la patogénesis de un gran número de enfermedades ^{2,6}.

La apoptosis presenta características definidas como fragmentación del DNA y segregación de la membrana nuclear, pérdida de contacto con las células vecinas, así como empaquetamiento del material citoplasmático lo que genera vesículas denominadas cuerpos apoptóticos ⁵.

La fagocitosis es un proceso a través del cual los microorganismos o material particulado son endocitados o ingeridos por fagocitos (neutrófilos o macrófagos). Los cuerpos apoptóticos son fagocitados impidiendo que moléculas citoplasmáticas, organelos y material genético queden libres entre las células, así evita que se produzca una respuesta inflamatoria y daño a células vecinas. La rápida fagocitosis de los cuerpos apoptóticos se debe al incremento de N-acetilglucosamina y fosfatidilserina en la membrana celular, que son señales para el reconocimiento por parte de los fagocitos ⁷.

2.2 Caspasas

Durante la apoptosis se presentan profundos cambios en las células que son regulados, en gran parte, por un grupo de cisteína-proteasas denominadas caspasas. Estas proteínas son sintetizadas en la célula como precursores inactivos o procaspasas, que al recibir la señal apoptogénica sufren un rompimiento proteolítico y dan lugar a dos subunidades que constituyen la enzima activa o caspasa. Una vez activadas se genera una cascada proteolítica que genera la lisis de proteínas celulares y el subsecuente fenotipo apoptótico ^{2,5}.

Las caspasas se pueden agrupar en dos clases por su estructura. Las de la clase I (-1, -2, -8, -9 y -10-) contienen un predominio N-terminal grande, su estructura permite su rompimiento autoproteolítico en sitios específicos. Las de clase II (-3, -6, -7) tienen un predominio N-terminal pequeño o carecen de él: ⁷. De acuerdo con su función también se han clasificado en iniciadoras (-2, -8, -9 y -10) y efectoras (-3, -6, y

-7) ⁸. La autoactivación de las caspasas de la clase I, o iniciadoras, permite que éstas activen a las procaspasas de la clase II, o efectoras, que no tienen la capacidad de autoproteolizarse. Una vez activas, las caspasas efectoras permiten la hidrólisis de diversas proteínas del citoesqueleto y del núcleo, así como de proteínas que intervienen en la división celular, en el control del ciclo celular, en la reparación, replicación y transcripción del DNA ⁷.

La cascada proteolítica de caspasas es regulada a distintos niveles por diversas proteínas. El primer nivel de regulación de caspasas radica en su activación. El segundo nivel de regulación consiste en la inhibición específica de las caspasas activas a través de las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) ⁸.

2.3 Vías de señalización en apoptosis

Existen dos cascadas principales para la ejecución de la apoptosis. La vía intrínseca que involucra a la mitocondria y la vía extrínseca que implica la participación de receptores de muerte celular, ambas vías culminan con la activación de caspasas efectoras ⁵.

En la vía extrínseca, los ligandos extracelulares de muerte, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF) y el ligando FAS o TRAIL, se unen a sus respectivos receptores de muerte. Ésto a su vez induce el reclutamiento de proteínas adaptadoras (FADD, TRADD o RAIDD) para formar el complejo de iniciación de señalización de muerte (DISC), mismo que recluta a la caspasa -8. En consecuencia, la caspasa -8 se autoproteoliza y activa a otras caspasas efectoras mediante proteólisis ^{8,9}.

La vía intrínseca puede ser inducida por diferentes estímulos como los fármacos antineoplásicos, la hipoxia, la irradiación, la disminución de factores de crecimiento y el choque térmico. Estos estímulos provocan la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (PMME) y la liberación de proteínas del espacio intermembranal hacia el citosol, tales como el citocromo C, Smac (Segundo Activador de Caspasas derivado de Mitocondria) y Omi /HtrA2 (proteína A2 de Alto Requerimiento de Temperatura) ^{9, 10}. Esta liberación permite el acoplamiento de un complejo multiprotéico llamado el apoptosoma. El apoptosoma está integrado por el citocromo-C, la procaspasa-9 y el factor citosólico inductor de apoptosis 1 (Apaf-1). El apoptosoma activa a la caspasa -9 quien a su vez induce la activación de caspasas efectoras -3, -6 y -7 ⁹.

La vía de receptores de muerte puede conectarse con la vía mitocondrial. Una vez que la caspasa-8 es activada, ésta puede activar a su vez a la proteína Bid. Bid es una proteína proapoptótica de la familiar Bcl-2 que facilita la liberación de citocromo C de la mitocondria, con la subsecuente formación del apoptosoma y la activación de la

caspara-9. El uso de cada una de estas cascadas depende de diversos factores, de los cuales los dos principales son el tipo de estímulo y el tipo celular^{7, 97, 97, 97, 99}.

2.4 Apoptosis en cáncer

La desregulación de la apoptosis puede irrumpir el balance entre proliferación y muerte celular dando origen a enfermedades como el cáncer. La supresión de la apoptosis es una característica de la mayoría y posiblemente de todos los tipos de cáncer⁸.

Un desequilibrio entre la cantidad de proteínas proapoptóticas, que inducen a la apoptosis, y de proteínas antiapoptóticas, que inhiben a la apoptosis; puede alterar el umbral apoptótico. Este desbalance inhabilita la respuesta al estrés celular, a las mutaciones deletéreas y/o al daño al DNA, lo que impide que se desencadenen los mecanismos que ejecutan la apoptosis^{5, 10}.

En la actualidad, gran parte de los fármacos administrados durante la quimioterapia inducen apoptosis, por lo tanto, las alteraciones en los mecanismos que la ejercen pueden contribuir a la ineficacia del tratamiento. Es por esto que los genes y las proteínas que controlan a la apoptosis son considerados potenciales blancos terapéuticos para el tratamiento del cáncer¹⁰.

3. IAPs

3.1 Descripción

Las proteínas inhibidoras de apoptosis o IAPs fueron originalmente descritas en virus (genes baculovirales). Se considera que son empleadas por los baculovirus para permitir la propagación viral mediante la prevención de la defensa apoptótica por parte de la célula hospedera^{8, 11}.

Las IAPs son una familia protéica que cumple un papel crítico en la adquisición de la resistencia a apoptosis, ya que la controlan a través de la inactivación directa de la cascada de caspasas. Las IAPs son las únicas proteínas endógenas capaces de regular tanto a caspasas iniciadoras como a efectoras¹¹.

3.2 Características de la familia IAPs

La familia de las IAPs está compuesta por ocho miembros: XIAP (proteína inhibidora de apoptosis ligada al cromosoma X), c-IAP1, c-IAP2, NAIP (proteína neuronal inhibidora de apoptosis), survivina, ILP2 (proteína tipo IAP), BRUCE y livin. La característica estructural que define a la familia de las IAPs es el dominio BIR (repetición baculoviral IAP), mismo que es rico en cisteína. Las IAPs pueden poseer ya

sea un dominio BIR (como survivina, BRUCE, livin y ILP2) o tres (como XIAP, cIAP1, cIAP2 y NAIP). Los dominios BIR tienen la propiedad de inhibir caspasas, constan de 70-80 aminoácidos y forman una estructura globular de cuatro a cinco alfa hélices, con número variable de hojas antiparalelas beta-plegadas. Una proteína es incluida en esta familia si posee uno o más dominios BIR. Adicionalmente, ciertos miembros de la familia IAPs poseen un carboxilo terminal RING (Nuevo Gen Realmente Interesante), que es un dominio de dedos de zinc con actividad de ligasa de ubiquitina E3 capaz de regular directamente la ubiquitinación y la degradación proteica de las IAPs. El dominio de reclutamiento de las caspasas (CARD) sólo está presente en c-IAP1 y c-IAP2 y tiene función en la diferenciación celular.^{11, 12}

3.3 Implicación de las IAPs en cáncer

Se considera que las IAPs contribuyen a la progresión del cáncer. La sobreexpresión de las IAPs es una característica común en muchos tipos de cáncer (cáncer de pulmón, próstata, colon, páncreas, gástrico, etc.)¹². Cuando las IAPs se encuentran sobreexpresadas, las células no son capaces de morir de forma fisiológicamente programada, y se vuelven resistentes a las quimio y radioterapias. En la actualidad, muchas estrategias se basan en eliminar o suprimir la actividad de las IAPs con el fin de reestablecer la sensibilidad a la apoptosis y mejorar la eficacia del tratamiento del cáncer⁸.

3.4 XIAP

XIAP es el miembro de las IAPs más estudiado, inhibe a la caspasa iniciadora -9, así como a las caspasas efectoras -3 y -7^{11, 13, 14}. Estudios de cinética *in vitro* han demostrado que XIAP es el más potente inhibidor de caspasas de la familia de las IAPs^{14, 15}. En un estudio de 60 líneas de cáncer humanas derivadas de cerebro, sangre y médula ósea, mama, colon, riñón, pulmón, ovario, próstata y piel, la proteína XIAP, se encuentra frecuentemente sobreexpresada al igual que en tejido tumoral comparado con tejido sano^{16, 17}. Asimismo, ha sido observado que la sobreexpresión de XIAP protege a las células de diferentes estímulos apoptóticos, tales como irradiación UV, irradiación γ , y fármacos quimioterapéuticos¹⁴.

XIAP consta de 497 aa, pesa 55 kDa, y se localiza en el cromosoma Xq24-25¹², posee tres dominios BIR (BIR1, BIR2 y BIR3) y un dominio RING. La caspasa efectora -3 es inhibida por la región entre los dominios BIR1 y BIR2, mientras que la inhibición de la caspasa efectora -7 requiere tanto de esta región como del dominio BIR2. La caspasa iniciadora -9 es inhibida en respuesta directa a la unión con el dominio BIR3 de XIAP, de este modo, previene o inhibe la muerte celular inducida por

diversos estímulos. Además, se ha establecido que el dominio RING de XIAP posee actividad de ligasa de ubiquitina provocando la degradación de caspasas por el proteosoma después de su interacción ¹¹ (Fig. 2).

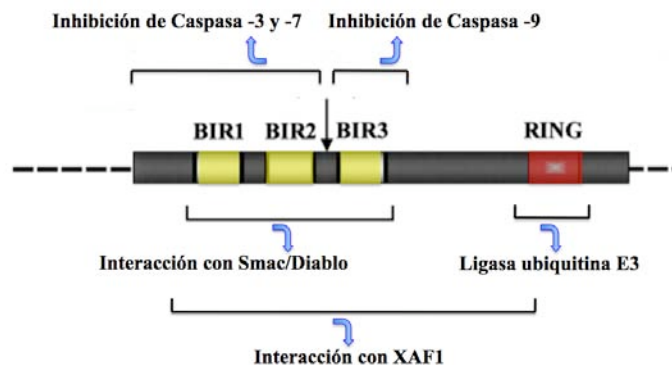


Figura. 2 Dominios funcionales de la proteína XIAP. Se muestran las proteínas de unión, así como la actividad mediada por estos dominios. (Modificado de Holick *et al.*, 2001).

El estudio de antagonistas de XIAP representa uno de los blancos más prometedores para disminuir el umbral apoptótico en células cancerosas ¹⁸. Dichas moléculas ayudan a mantener y regular el balance apoptótico, tienen la capacidad de sensibilizar a las células cancerosas a agentes quimioterapéuticos, contrarrestar la actividad inhibitoria de XIAP y por lo tanto favorecer la apoptosis ¹⁴. Se han identificado como antagonistas de XIAP a las proteínas Smac, Omi/Htr2 y XAF1 (factor asociado a XIAP) ⁸.

4. XAF1

4.1 Descripción

XAF1 fue inicialmente identificado como una proteína de unión a XIAP, actualmente es reconocido como uno de los principales antagonistas de XIAP. XAF1 puede inhibir a XIAP sin requerir ningún tipo de señal de activación ni la necesidad de ser liberado dado que no se encuentra dentro de la mitocondria. A diferencia de XAF1, Smac y Omi sí deben ser liberadas de la mitocondria al citoplasma para neutralizar la actividad inhibitoria de XIAP en respuesta a estímulos apoptóticos ¹³, además requieren ser procesados para revelar el motivo N-terminal que interacciona con el dominio BIR de XIAP ¹¹. En cambio, XAF1 tiene una distribución predominante nuclear aunque también se encuentra en el citoplasma ^{19, 20}. Se ha establecido que XAF1

desencadena la redistribución de XIAP del citoplasma al núcleo, de esta forma inhibe su actividad antiapoptótica ¹³. XAF1 es capaz de sensibilizar a la célula a apoptosis ante diferentes estímulos tales como etopósido ¹³, TNF α ²¹, cisplatino ²² y UV ^{21, 22} entre otros.

4.2 Características XAF1

XAF1 fue recientemente identificado mediante el sistema de dos híbridos, al utilizar a XIAP como carnada ¹³. La proteína consiste de siete dominios de dedos de zinc, no obstante, aún no se han determinado sus funciones bioquímicas, ni a aquellas que conciernen la unión a XIAP ¹⁸. XAF1 consta de 301 aminoácidos y pesa 34 kDa ¹⁸. Se han identificado tres isoformas generadas por splicing alternativo del RNAm: XAF1(A), XAF1(B) y XAF1(C); siendo XAF1(A) la principal isoforma, la de mayor tamaño y la frecuentemente reportada. Hasta ahora no se han definido funciones específicas de XAF(B) y XAF(C), sólo han sido identificadas a nivel transcripcional. Sin embargo, se ha observado que las tres variantes se encuentran expresadas de forma diferencial tanto en tejido normal como en células cancerosas ^{16, 18, 23}.

El gen XAF1 ha sido estudiado tanto en su estructura genómica como en sus niveles de expresión. *XAF1* existe como un sólo gen con ocho exones, los cuales se localizan en el cromosoma 17p13.2¹³ (**Fig. 3**).



Figura. 3 Estructura genómica de *XAF1* y sus ocho exones (Plenchette et al., 2007).

Hasta la fecha, no se han observado mutaciones dentro de la secuencia genómica de XAF1 que pudieran alterar su función¹⁸.

4.3 XAF1 como candidato a gen supresor de tumores

Investigaciones recientes apoyan la idea que el gen XAF1 pudiera ser considerado un gen supresor de tumores debido a las observaciones en células tumorales en cuanto a sus bajos niveles de expresión tanto a nivel de RNAm como a nivel protéico con respecto a células sanas ^{8, 14, 16, 18-20, 24-28}. En un estudio donde se compararon muestras de pacientes de tejido normal contra tejido tumoral renal, se observó que la baja expresión protéica de XAF1 correlacionó con la progresión

tumoral¹⁹. También se ha observado que la expresión de XAF1 se encuentra significativamente reducida en melanoma humano, en comparación con tejido sano²⁰. En adenocarcinoma gástrico, cáncer colorrectal, pancreático y urogenital, XAF1 es expresado en niveles protéicos más bajos en tejido tumoral y líneas celulares cancerosas respecto al tejido normal^{18, 20, 24}.

En general, el RNAm de XAF1 se encuentra expresado de forma ubicua en tejido normales adultos así como en tejido fetal, pero es indetectable o está presente en muy bajos niveles en varias líneas celulares de cáncer^{13, 16}. El análisis de expresión de 60 líneas celulares reveló niveles muy bajos o indetectables de RNAm de XAF1. Asimismo, los niveles de RNAm de XIAP en las mismas líneas han sido evaluados, y a pesar de que no todas las líneas muestran una correlación inversamente proporcional entre los niveles de XAF1 y XIAP, se puede apreciar que altos niveles de expresión de RNAm de XIAP junto con bajos niveles de RNAm de XAF1 es una característica en líneas celulares tumorales analizadas^{13, 16}.

Adicionalmente, se ha reportado que la inhibición de la expresión de XAF1, en células que expresan elevados niveles de la proteína, también incrementan la resistencia a apoptosis inducida por etopósido¹³. Por el contrario, la expresión ectópica o inducción endógena de XAF1, aumenta la sensibilidad a apoptosis inducida por diversos estímulos proapoptóticas, ya sea a través de la vía intrínseca o extrínseca^{18, 29}. Entre dichos estímulos apoptóticos, se encuentran: rayos ultravioleta, etopósido, interferón (IFN) y el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL)^{13, 18, 21, 26, 30}.

Recientemente se ha realizado terapia génica mediada por adenovirus en modelos xenográficos de ratón. En donde se pudo observar que XAF1 en cooperación con TRAIL pueden suprimir el crecimiento de cáncer de colon e inducir la regresión tumoral *in vivo*²².

Los análisis citogenéticos realizados en varios tejidos tumorales han demostrado que la región cromosómica humana 17p13.1 a 17p13.3, en donde se localiza XAF1, es rica en genes supresores de tumores y esta zona está asociada con frecuentes alteraciones genéticas; entre otros, el gen supresor de tumores p53³¹. Aunque XAF1 posee muchas características de un supresor de tumores, no se han observado mutaciones del gen XAF1, lo que sugiere que ocurren mecanismos regulatorios alternos para suprimir la expresión del gen XAF1¹⁸.

4.4 Regulación de la transcripción de XAF1

El silenciamiento de la expresión de XAF1 es un hecho relevante en la progresión de varios tipos de cáncer, resultan de gran importancia los estudios relacionados con los mecanismos que regulan tanto la represión como la activación de la transcripción del gen XAF1 ¹⁸.

4.4.1 Regulación transcripcional de genes

La ejecución de procesos biológicos como el desarrollo, proliferación, apoptosis y diferenciación, requieren precisión en los niveles de expresión de los genes implicados. La regulación de la transcripción inducible es un mecanismo central en la expresión de genes. Se basa en la determinación de los genes que serán transcritos a RNAm. Los elementos de respuesta son regiones regulatorias de genes que se encuentran dentro de la región promotora del gen. Por ejemplo, los genes cuya transcripción es inducida en respuesta a la exposición de temperatura elevada, contienen un elemento de regulación común conocido como elemento de choque térmico (HSE)³².

Los factores de transcripción inducibles son proteínas que regulan los elementos de respuesta de sus genes blanco. Pueden ser activadores o represores, dependiendo si la regulación es positiva o negativa respectivamente^{33, 34}.

4.4.2 Regulación negativa de XAF1

Existen diversos mecanismos regulatorios que pueden suprimir la expresión de XAF1, entre los que se han descrito, se encuentran la pérdida de heterocigosidad, la hipermetilación de su secuencia promotora y la represión del promotor por parte de algún factor de transcripción negativo ².

La pérdida de heterocigosidad (LOH) es un evento temprano frecuentemente asociado con la pérdida de expresión de un gen ¹⁶, con base en las frecuentes pérdidas de la región 17p13, donde se localiza XAF1 ³⁵. La LOH representa la pérdida de función del alelo de un gen donde el otro alelo ya estaba inactivado. Se produce cuando el alelo funcional restante en una célula se inactiva por mutación. La LOH recurrente en una determinada región cromosómica, indica la presencia de uno o varios genes supresores de tumores en esa región ². En un estudio realizado con líneas celulares NCI 60, se observó que hay baja heterocigosidad, lo que sugiere que la pérdida de XAF1 es prevalente en líneas celulares tumorales ¹⁶. Recientemente se identificó al gen XAF1 como un blanco de la pérdida de heterocigosidad en tumorigénesis colorrectal humana localizada en el sitio cromosómico 17p13.2 ³⁵.

La metilación del DNA es un mecanismo implicado en la supresión de la expresión de genes. Consiste en la adición de un grupo metilo, por las DNA metiltransferasas (DNMTs), en alguna citosina dentro de sitios CpGs (CpG = C-grupo fosfato-G) ². Se ha establecido que la inactivación epigenética de genes supresores de tumores por hipermetilación, es una característica común en muchos tipos de cáncer ². La inactivación transcripcional de XAF1 está asociada con la metilación de la región promotora del gen por lo menos en cáncer de estómago, vejiga, riñón, próstata, colorrectal y urogenital ^{25, 26, 35-37}. Se ha observado que la expresión de RNAm de XAF1 es muy baja o nula en líneas tumorales gástricas así como en tumores primarios debido a hipermetilación en sitios CpG dentro del promotor, mientras que ninguno de estos tumores mostró dicha anomalía respecto a SMAC/Diablo y Omi/HtrA2 ²⁵. Asimismo, se observó que la baja expresión de XAF1 dada por hipermetilación, está fuertemente asociada con etapas avanzadas del tumor ²⁵. Adicionalmente, se ha reportado en diversas líneas celulares que la expresión de XAF1 se puede restaurar o reactivar con 5-aza-deoxicitidina, un agente desmetilante ²⁶.

El factor de choque térmico (HSF1) es un factor de transcripción descrito que regula negativamente la expresión de XAF1. Específicamente, el control negativo de la expresión de XAF1 por HSF1 ocurre a través de la unión a un elemento de unión a HSF1 dentro del promotor. En tejido gástrico y en líneas celulares de cáncer de colon, se observó que la baja expresión del gen XAF1 inducida por HSF1 es dependiente de la respuesta a estrés celular endógeno. Asimismo, se detectaron disminuidos los niveles de XAF1 y aumentados los de HSF1 como un mecanismo de sobrevida celular, por lo tanto, parece actuar como otro tipo de control que mantiene un bajo nivel de la expresión de XAF1 ³⁸. Recientemente se identificó un elemento de respuesta dentro del promotor de XAF1 para p53 en cáncer gastrointestinal, y se demostró que p53 puede suprimir la transcripción de XAF1 a través de la interacción con su secuencia promotora ³⁹.

4.4.3 Regulación positiva de XAF1

Varios trabajos han documentado la importancia del papel de XAF1 en la sensibilización de las células a apoptosis mediado por interferón (IFN). Específicamente, IFN β es considerado un factor de transcripción implicado en la regulación transcripcional positiva, dado que reactiva de manera significativa la expresión de XAF1 en líneas celulares de melanoma. Los eventos de señalización mediados por IFN, incluyendo la activación transcripcional positiva de XAF1, requieren del factor-1 regulatorio de IFN1 (IRF-1). IRF-1 a su vez, requiere unirse a un elemento

de respuesta de IRF-1 (IRF-E), mismo que se encuentra en la secuencia promotora de XAF1. Además, se ha observado que IFN β puede activar la expresión de XAF1 a pesar de la hipermetilación del promotor, lo cual implica que XAF1 es un gen responsivo a IFN (ISG)^{18, 36}. Por otro lado, se sabe que todos los miembros de la familia TNF comparten una vía de señalización celular en común que regula la activación de NF- κ B, asimismo, todos los tipos celulares responden a la activación de NF- κ B mediada por TNF⁴⁰. Recientemente se reportó que TNF α puede inducir la expresión de XAF1 a través de la activación de NF- κ B. En este estudio se observó que después de la exposición de TNF α a células del trofoblasto, se incrementó la expresión de la forma activa de NF- κ B (65 kDa) en el núcleo. Asimismo, dichas células se sometieron a tratamiento con SN50 (un inhibidor de la translocación de NF- κ B a núcleo) junto con TNF α y se observó un decremento en la expresión de la proteína XAF1 en comparación con TNF α por sí solo, lo que sugiere que NF- κ B podría activar la transcripción de XAF1 ante tratamiento con TNF α ⁴¹. Este dato es relevante dado que invita a realizar estudios respecto a los mecanismos mediante los cuales NF- κ B puede regular la transcripción de XAF1.

5. NF- κ B

5.1 NF- κ B como factor de transcripción

El factor nuclear κ B (NF- κ B), es un factor de transcripción inducible que controla la expresión de un gran número de genes relacionados con la sobrevivencia celular, la diferenciación y la proliferación⁴². Fue descubierta como una proteína unida al gen inmunoglobulina κ en el núcleo de las células B⁴³. NF- κ B consiste en cinco proteínas: p50, p52, c-Rel, RelA/p65 y RelB; mismas que forman homodímeros u heterodímeros⁴⁴ (**Fig. 4**). De manera general, NF- κ B es retenida en el citoplasma por proteínas específicas, los inhibidores de NF- κ B (I κ Bs), e inmediatamente río arriba se encuentra el complejo I κ B cinasa (IKK)⁴⁵. Varias vías de estimulación celular convergen en la activación del complejo IKK, mismo que subsecuentemente fosforila I κ Bs y las marca para su posterior ubiquitinación y degradación por el proteosoma 26S. De este modo, NF- κ B es liberado y se transporta al núcleo para ejercer funciones transcripcionales⁴⁶. De los posibles dímeros de NF- κ B, al menos doce son capaces de unirse a sitios de DNA y regular potencialmente la transcripción⁴⁴. Dichos sitios, llamados sitios κ B, consisten de 9 a 10 pares de bases, tienen una gran variabilidad, y está conformado por: 5´-GGGRNWYYCC-3´; en donde R puede ser A o G; N puede representar cualquier nucleótido; W representa A o T; e Y equivale a C o a T^{42, 44, 47}.

No obstante, se ha planteado la existencia de otros sitios κ B distintos a la secuencia consenso para otros heterodímeros de NF- κ B tales como RelB/p52 ⁴⁸.

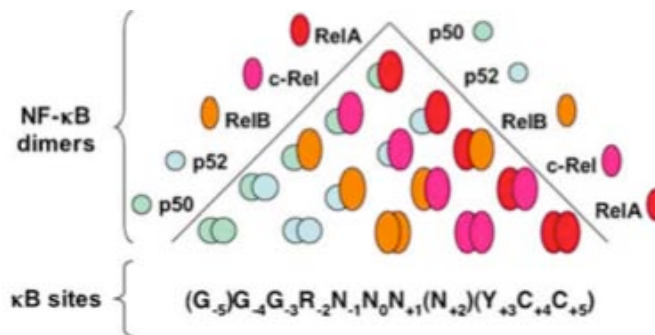


Figura 4. Componentes moleculares de NF- κ B. Muestra los posibles dímeros que comprende NF κ B y la secuencia consenso del sitio κ B. (Hoffmann *et al*, 2006).

5.2 Vía Canónica NF- κ B

En la vía clásica o canónica, los dímeros de NF- κ B como RelA/p50 son mantenidos en el citoplasma por interacción con I κ B, usualmente I κ B α . En muchos casos, la unión de un ligando al receptor de superficie celular (por ejemplo, receptor de factor de necrosis tumoral, TNF-R) recluta adaptadores tales como factores asociados a TNF-R (TRAFs) o RIP, una cinasa adaptadora esencial para la activación de NF- κ B por TNF al dominio citoplasmático del receptor. En consecuencia, estos adaptadores reclutan al complejo IKK. Este reclutamiento de moléculas en el receptor activa al complejo IKK. IKK entonces fosforila a I κ B en dos residuos de serina, ésto conlleva a su ubiquitinación y degradación por parte del proteosoma. NF- κ B por lo tanto, entra al núcleo para activar genes blanco ^{42, 44} (**Fig. 5**).

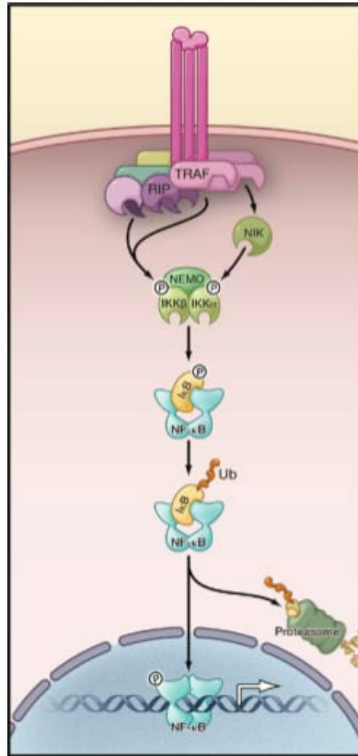


Figura 5. Vía de señalización de NF-κB. Esquema general de la ruta de activación de NFκB. (Hayden and Ghosh, 2008).

5.3 Vía no Canónica

Adicionalmente, está descrita la vía no canónica, el paso común regulatorio en ambas vías es la activación del complejo IKK. La vía no canónica difiere de la canónica ya que sólo determinadas señales la activan, y porque procede a través del complejo IKK con dos subunidades IKK α , pero no NEMO. La unión al receptor conlleva a la activación de la cinasa de inducción de NF-κB (NIK), misma que activa y fosforila al complejo IKK α , y a su vez, éste fosforila dos residuos de serina adyacentes a las repeticiones de ankirina del dominio de p100, de esta forma provoca su proteólisis parcial y la liberación del complejo p52/RelB. En ambas vías, gran variedad de modificaciones post-traduccionales (fosforilación, acetilación, etc.) de las subunidades de NF-κB pueden modificar la actividad transcripcional ⁴⁹.

II. Justificación

La baja expresión de XAF1 está asociada a la progresión de tumores malignos en varios tipos de cáncer, sin embargo, es necesario un mayor entendimiento de los mecanismos moleculares que regulan su transcripción, así como conocer aquellos factores que pueden alterar su expresión en diferentes neoplasias.

En este trabajo se pretende realizar un primer acercamiento al estudio de la regulación transcripcional de XAF1, mediante el diseño y la realización de dos construcciones génicas las cuales contienen regiones del promotor de XAF1 con posibles sitios para el reconocimiento de NF- κ B y que además, pueden actuar como regiones de regulación transcripcional de XAF1. Los resultados de este trabajo podrían servir de base en futuros ensayos experimentales.

III. Objetivos

1. Objetivo General

Analizar los sitios de unión del factor de transcripción NF- κ B en la región promotora del gen XAF1.

2. Objetivos Particulares

1. Realizar un análisis *in silico* de la secuencia promotora de XAF1 mediante programas de análisis bioinformático con el fin de determinar los sitios probables de unión de NF- κ B .
2. Realizar construcciones génicas con el promotor del gen XAF1 en vectores de expresión para estudiar la transcripción ante NF- κ B.

IV. Métodos

1. Análisis *in silico* de los posibles sitios de unión a NF- κ B en XAF1

Para el análisis *in silico* de los posibles sitios de unión a Nf- κ B dentro del promotor de XAF1, primero se descargó la secuencia promotora de la base de datos de elementos regulatorios transcripcionales (TRED), disponible en:

<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED/tred.cgi?process=home>. Posteriormente se utilizaron tres programas bioinformáticos que predicen la localización de posibles sitios de unión a factores de transcripción dentro de secuencias promotoras. Dichos programas son: TESS, CHIP y Genomatix (MatInspector). Disponibles en <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess?RQ=WELCOME>, <http://snpper.chip.org> y <http://www.genomatix.de/products/MatInspector/index.html> respectivamente.

Asimismo, se utilizó Ensembl, un software que consiste en una base de datos genómicos de múltiples especies, con el cual se realizaron los alineamientos de las secuencias de DNA. Ensembl se encuentra disponible en: <http://www.ensembl.org/index.html>.

Por otro lado, se utilizó GEO NCBI, un archivo de datos genómicos funcionales que son presentados por la comunidad científica. Esta búsqueda de datos se realizó con el fin de obtener información que apoyara la relación entre XAF1 y NF κ B. Se tiene acceso a dicho programa en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>. Finalmente, se empleó el programa bioinformático OncoPrint para comparar la expresión de RNAm de múltiples genes al mismo tiempo y estimar las relaciones entre éstos en base a microarreglos, dicho software se encuentra disponible en: <https://www.oncoPrint.org/resource/login.html>.

2. Extracción de DNA

A partir de sangre periférica humana se obtuvo DNA genómico para ser utilizado como templado en la amplificación del producto de la secuencia promotora de XAF1. Se utilizó el juego de reactivos de QIAGEN®, QIAamp DNA Blood Mini Kit, de la siguiente forma: 20 μ l de proteinasa K, 200 μ l de sangre periférica y 200 μ l Buffer AL se vortexeó e incubó a 56°C por 10 minutos. Posteriormente se agregaron 200 μ l de etanol al 100%, se vortexeó y centrifugó brevemente. Se transfirió la mezcla a la columna de centrifugación (QIAamp Mini spin column) y ésta a un tubo de recolección, se centrifugó 1 min. a 8000 rpm. Después, la columna se transfirió a un tubo nuevo y

se le agregaron 500µl de Buffer AW1, se centrifugó 1 min. a 8000 rpm. La columna se transfirió a otro tubo, se le adicionaron 200µl de Buffer AW2 y se centrifugó 3 min, a 14000 rpm. Finalmente, se transfirió la columna a un tubo de centrifugación y se le agregaron 200µl de agua MilliQ. Se almacenó a -20°C hasta su uso.

3. PCR

3.1 Descripción de los oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron diseñados con un sitio de reconocimiento enzimático en el extremo 5' para facilitar la clonación del producto de PCR amplificado en el vector de expresión pSEAP2basic . Los oligonucleótidos que amplifican las 600pb del promotor del gen XAF1 fueron: Sentido (Hind III): 5'-TAA GCT TCT GTT AGC ACA GCT GTT TCT AGG GTC TG – 3' y Antisentido (Nru I): 5'- ATT CGC GAG TTT CGT TTC TTG CAG GC – 3'. Los oligonucleótidos que amplifican las 1200pb fueron: Sentido (Xho I) : 5'- ACT CGA GAT TTT TCA TTC TTG ATA TTG ACA GAC TGC – 3' y Antisentido (Nru I): 5'- ATT CGC GAG TTT CGT TTC TTG CAG GC – 3'. El oligonucleótido antisentido fue el mismo para ambas amplificaciones de PCR.

3.2 Condiciones de la PCR

La PCR se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo: 0.5 U de polimerasa Taq ROCHE[®], buffer ROCHE[®], 10 pMol de cada uno de los oligonucleótidos, 200 µM de desoxirribonucleótidos (dNTPs), 150 ng de DNA genómico y de agua MilliQ por reacción .

Se empleó una variante de PCR llamada Touchdown⁵⁰ para optimizar la especificidad de la reacción, misma que emplea una temperatura de alineamiento por arriba de la temperatura media (Tm) que baja progresivamente hasta alcanzar dicha Tm.

La PCR para XAF 600 se inició a 94° C por 2 minutos seguida de la variante Touchdown que consistió de cinco ciclos donde la temperatura de alineamiento fue bajó un grado hasta alcanzar la Tm: 94° C por 30 segundos, 67.6° C – 63.6° C por 30 segundos y 72° C por 45 segundos, seguido de 30 ciclos de 94° C por 30 segundos (desnaturalización) , 62.6 ° C por 30 segundos (alineamiento), 72° C por 45 segundos (elongación), con una extensión final de 72° C por 7 minutos.

La reacción de PCR se realizó en el termociclador Gene AmpPCR System 9700 de Applied Biosystems. La presencia de los productos se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%.

Para amplificar el producto de XAF 1200 se utilizó una temperatura media de 62 ° C, el resto de las condiciones fueron las mismas que las mencionadas para XAF 600.

4. Purificación de los productos de PCR

Los productos amplificados con los oligos XAF 600 y XAF 1200, fueron analizados en un gel de agarosa al 1.5 % con bromuro de etidio al 5% por electroforesis. Posteriormente se cortaron y pesaron las fracciones del gel que contenían la banda de los productos de PCR para ser purificados con el Kit QIAquick Gel Extraction de QIAGEN de la siguiente forma: se agregaron 3 volúmenes de Buffer QG a un volumen del gel. Posteriormente se incubó a 50° C por 10 minutos, una vez disuelto se transfirió la mezcla a una columna (QIAquick spin column) y ésta a un tubo de recolección, se centrifugó un minuto a 13 000 rpm para que se uniera el DNA a la membrana de la columna. Después, para remover los restos de agarosa, se desechó el centrifugado y se le agregó 500µl de Buffer QG a la columna y se centrifugó por a 13 000 rpm un minuto, nuevamente se desechó el centrifugado y se volvió a centrifugar por un minuto adicional. Para lavar, se agregaron 750µl de Buffer PE a la columna y se centrifugó por un minuto. La columna fue transferida a un tubo de centrifugación, finalmente, para eluir el DNA, se le agregaron 30 µl de agua MilliQ y se centrifugó un minuto a 13 000.

5. Clonación en el vector pTZ57R/T

Los productos de PCR obtenidos fueron ligados en el vector linearizado pTZ57/RT. Este vector es específico para clonar productos de PCR generados a partir de DNA polimerasas que añaden adeninas en los extremos del producto de PCR, tales como la polimerasa Taq que fue empleada. Además dicho vector presenta extremos ddT para la óptima inserción de los productos de PCR, consta de 2886 pb, presenta un sitio múltiple de clonación dentro del gen *lac Z*, así como un marcador de resistencia para ampicilina (**Fig. 6**).

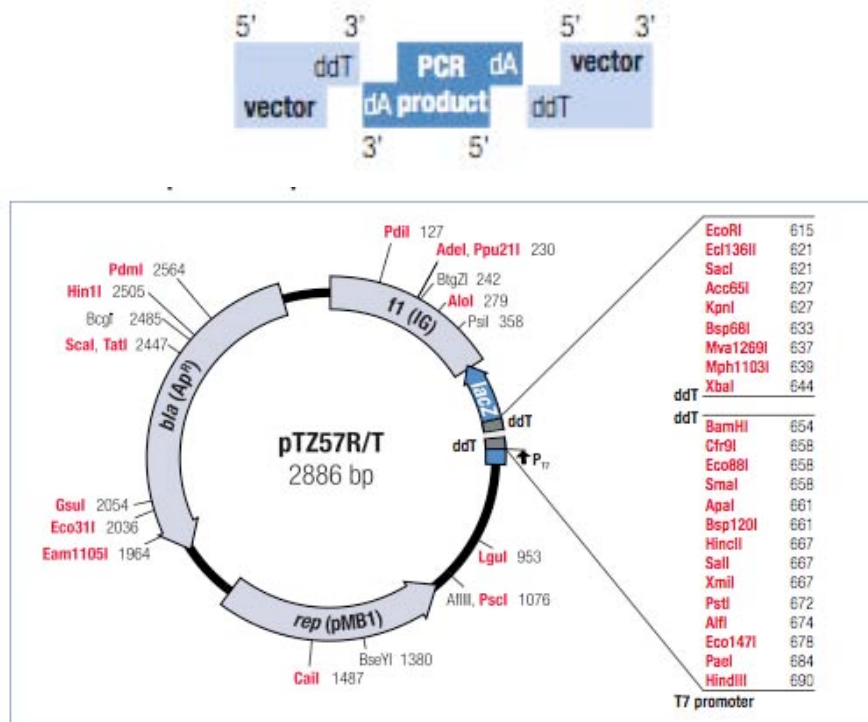


Figura 6. Mapa del vector pTZ57R/T. Se empleó este vector para clonar los productos de PCR. El sitio múltiple de clonación se encuentra previamente cortado, presenta una timina en sus extremos y se encuentra localizado dentro del gen Lac Z.

El producto amplificado por PCR XAF600 se ligó en el vector linealizado pTZ57/RT, con una proporción inserto/vector de 3:1, con el juego de reactivos InsTAclone de FERMENTAS[®] de la siguiente forma: 3µl del vector (0.15 µg, 0.18 pmol de extremos), 5.4µl del inserto (0.108 µg, 0.54 pmol de extremos), 6µl del buffer de ligación 5x, 1 µl de ligasa DNA T4 y agua Milli Q a un volumen total de 30 µl. Esta mezcla de ligación se incubó a 22 °C por una hora, y finalmente se almacenó a 4 °C una noche. Para el producto de PCR XAF1200 se realizó el mismo procedimiento pero para la mezcla de ligación se tomaron 22 µl del inserto (0.216 µg, 0.54 pmol de extremos).

5.1 Transformación

Después de la ligación, se realizó la transformación de la cepa bacteriana *E. coli* DH5α con el juego de reactivos TransformAID de FERMENTAS[®] de la siguiente manera: se incubaron las bacterias en medio-C durante 2 horas a 37° C en agitación, se centrifugó por un minuto a 4000 rpm, el botón se resuspendió en 300 µl de solución T (compuesta por solución A más solución B) y se incubó 5 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó un minuto en la microcentrífuga, el botón se resuspendió en 120 µl de solución T, se dejó 5 minutos en hielo. Después, se agregaron 50 µl de

las células bacterianas preparadas a un tubo con 2.5 µl de la mezcla de ligación, se sometió a choque térmico 45 segundos a 45° C y se incubó por 5 minutos en hielo. Finalmente, se sembraron en cajas con medio LB suplementado con ampicilina, IPTG/X-Gal y se incubaron a 37° C durante toda la noche. Por último, las colonias recombinantes se seleccionaron mediante alfa complementación.

5.2. Extracción de los plásmidos: pTZ57RT/XAF600 y pTZ57RT/XAF1200

5.2.1 Lisis Bacteriana

Las colonias seleccionadas por alfa complementación se inocularon en 5 ml de medio LB con ampicilina, se incubaron por 24 horas a 37°C en agitación. Después se recuperaron las bacterias por centrifugación a 4000 rpm 5 minutos, se le agregaron 100 µL de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl pH 8.0 25 mM, EDTA 10 mM), seguida de 200µL de solución II (196 µL SDS y 4 µL NaOH) y 150 µL de solución III (acetato de potasio 3M y ácido acético 2M). Finalmente se centrifugaron 10 minutos a 10 000 rpm.

5.2.2 Obtención del plásmido

Para la obtención del plásmido se realizó un miniprep con el Kit BIO 101 Systems. Se recuperó el sobrenadante de la última centrifugación y se le adicionaron 400 µL de MiniPrep Express™ Matrix de QBIogene, después se dejó reposar por 5 minutos, el DNA se une instantáneamente a dicha matriz. Posteriormente, se obtuvo el botón con un minuto de centrifugación en la microfuga y se agregaron 500µL de etanol al 80%, finalmente se resuspendió en 75µL de agua MilliQ.

5.3. Restricción enzimática de los plásmidos: pTZ57RT/XAF600 y pTZ57RT/XAF1200.

5.3.1 Comprobación de la presencia del fragmento de interés

Para corroborar que estuviera integrado el inserto dentro del vector pTZ57R/T, se llevó a cabo la digestión del DNA plasmídico con endonucleasas y su respectivo buffer y se dejó 2 horas a 37 °C.

Para pTZ57RT/XAF600 se emplearon las enzimas Msc I y Xba I para la obtención de un fragmento de 3043 pb y otro de 440 pb. Para pTZ57RT/XAF1200 se emplearon las enzimas Msc I y Xho I para la obtención de un fragmento de 3053 pb y otro de 1108 pb.

Los productos digeridos se analizaron en un gel de agarosa al 1.5 % con

bromuro de etidio.

5.3.2 Liberación del fragmento de interés

Una vez que se comprobó la presencia del fragmento de interés, se escindieron los insertos del vector mediante las enzimas de restricción presentes en la región 5' de los oligos de amplificación, Nru I y Hind III para el inserto de 6000 pb y NruI y Xho I para el de 1200 pb.

Para pTZ57RT/XAF600 se emplearon las enzimas Hind III y Nru I. Como los correspondientes buffers de dichas enzimas no son compatibles, primero se realizó la digestión con Hind III/Buffer 2, se utilizó como referencia 20µg del DNA plasmídico, se dejó 2 horas a 37 °C. Después se purificó por solución mediante el Kit QIAquick PCR Purification, para eliminar las sales del buffer y la enzima, y de esta forma poder digerirlo con Nru I. Dicha digestión se dejó 2 horas a 37 °C y después toda la noche a temperatura ambiente. La digestión del plásmido con ambas enzimas liberó al fragmento de interés de 600 pb del vector pTZ57RT, dicho fragmento fue purificado por gel mediante el Kit QIAquick Gel Extraction de QIAGEN.

Para pTZ57RT/XAF1200 se emplearon las enzimas Xho I y Nru I. Al igual que con pTZ57RT/XAF600, los buffers de las enzimas Xho I y Nru I no son compatibles, por lo tanto, primero se realizó la digestión con Xho I/Buffer 3, se utilizó como referencia 10µg del DNA plasmídico, se dejó 2 horas a 37 °C. Después se purificó por solución mediante el Kit QIAquick PCR Purification, para eliminar las sales del buffer y la enzima, y de esta forma poder digerirlo con Nru I. Dicha digestión se dejó 2 horas a 37 °C, después toda la noche a temperatura ambiente. La digestión del plásmido con ambas enzimas liberó al fragmento de interés de 1200 pb del vector pTZ57RT, dicho fragmento fue purificado por gel mediante el Kit QIAquick Gel Extraction de QIAGEN.

6. Clonación en el vector pSEAP2-basic

El vector pSEAP2-basic contiene el gen reportero de fosfatasa alcalina secretada (SEAP). Este vector carece de promotor y tiene un sitio múltiple de clonación (MCS) que permite que sean insertados fragmentos de DNA de promotores probables río arriba del gen SEAP (**Fig. 7**).

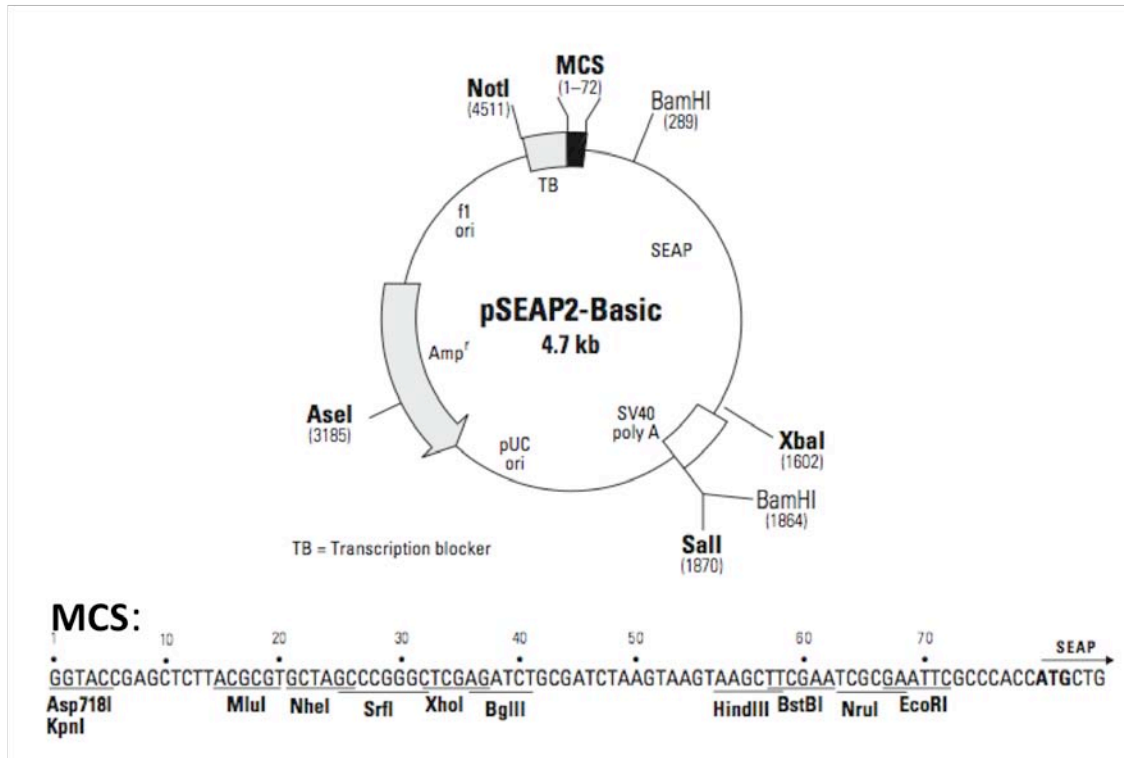


Figura 7. Mapa del vector pSEAP2-básico. Se empleó este vector para clonar los productos de 600 y 1200 pb. El sitio múltiple de clonación fue abierto con enzimas de restricción específicas.

6.1 Amplificación y extracción del vector pSEAP2-básico

Para obtener suficiente cantidad del vector pSEAP2-básico, se inocularon bacterias de *E. coli* DH5 α previamente transformadas con el plásmido para posteriormente ser extraído por Maxi-prep. Una vez extraído el plásmido, se realizó la confirmación de la identidad del vector por digestión con Bgl II y Bst I.

6.1.2 Apertura del vector pSEAP2-básico

Dado que el vector pSEAP2-básico se encontraba circularizado, se abrió con las mismas enzimas de restricción con las que fueron digeridos los fragmentos a clonar, para que de este modo se facilitara la ligación. Para la inserción del fragmento del promotor de 0 a 600 pb se abrió el vector con las enzimas Hind III y Nru I y para la inserción del fragmento de 0 a 1200, se abrió con las enzimas Xho I y Nru I.

6.2 Ligación pSEAP-básico /XAF1

Para XAF 600 se utilizó una relación inserto/vector de 1:1 y de 1:3. Se tomó como referencia 50 ng vector y 19.14 ng del inserto para 1:1. Para 1:3 se emplearon 50ng del vector y 38.29 ng del inserto. Además se metió la ligación control, la cual careció de inserto. Este control sirvió para estimar la proporción de recircularización del vector que no integró el inserto, respecto a la que sí lo integró.

Para XAF1 de 0 a 1200 se utilizaron las mismas relaciones 1:1 y 1:3 inserto/vector: 40.53 ng y 89.06 ng del inserto respectivamente, más el control de recircularización.

6.2.1 Transformación y selección de colonias

Para la transformación de bacterias se utilizó el Kit Bacterial Transformation de FERMENTAS, se emplearon 5 µl de la mezcla de ligación. Posteriormente fueron sembradas en placas con agar LB suplementado con ampicilina y se dejaron en incubación a 37° durante toda la noche. Se empleó el mismo procedimiento para ambas ligaciones.

6.3 Extracción de plásmidos y digestión

Se utilizó el Kit Miniprep BIO 101 Systems (a mini-escala) para extraer el plásmido, de la misma forma en la que se describió previamente. Posteriormente los plásmidos extraídos fueron digeridos para ver si fue posible la integración del inserto. Se realizó el mismo protocolo para los dos plásmidos.

6.3.1 Selección de colonia, amplificación y extracción plasmídica

La colonia que mostró el patrón de digestión esperado se amplificó nuevamente para ser extraído por el Kit S.N.A.P. Miniprep de Invitrogen (a mini-escala), el cual permite que el plásmido extraído pueda ser mandado a secuenciar posteriormente. Dicho procedimiento se siguió de la misma forma para ambos plásmidos.

6.4 Secuenciación y análisis del fragmento clonado

Una vez extraídos los plásmidos por el Kit comercial, se mandaron a secuenciar con los oligonucleótidos sentido (5'-CTAGCAAATAGGCTGTCCC-3') y antisentido (5'-CCTCGGCTGCCTCGCGTTCC-3') del sitio múltiple de clonación de pSEAP-basic, con el secuenciador de Applied Biosystems (AB), modelo 3730XL del INMEGEN. Esta secuenciación permitió conocer la identidad de las bases nucleotídicas que conforman el inserto integrado, así como la unión de éste al vector. Los resultados que arrojó la secuenciación fueron analizados con BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local que compara una secuencia determinada contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos.

Los análisis de secuenciación se llevaron a cabo tanto para 600pb como para 1200pb.

6.5 Amplificación y extracción por Kit para transfección.

Las bacterias con las clonaciones seleccionadas fueron amplificadas para posteriormente extraer el plásmido a gran escala con el Kit comercial Endofree Plasmid Maxi de QIAGEN. Esto se realizó con el fin de obtener suficiente cantidad de DNA plasmídico purificado para eventualmente ser transfectado a células tumorales en futuros ensayos experimentales.

V. Resultados

1. Ensayo *in silico*

La secuencia promotora del gen XAF1 fue obtenida de la base de datos de elementos regulatorios transcripcionales (TRED) (**Fig. 8**). A partir de esta secuencia promotora teórica realicé el análisis *in silico* para determinar los probables sitios de unión a NF- κ B y definí las -1200 pares de bases previas al inicio de transcripción. Posteriormente determiné la localización de sitios probables de reconocimiento de NF- κ B dentro del promotor de XAF1 mediante tres diferentes programas para identificación de dichos sitios (**Fig. 9A – 9D**). Estos datos me permitieron elegir dos fragmentos del promotor con una longitud de ~ 600 y 1200 pb respectivamente. Posteriormente, realicé un alineamiento de la secuencia promotora con diferentes especies de mamíferos, en donde se observó, a partir del alineamiento de secuencias con Ensembl, que el sitio correspondiente a 1200 pb (gggaattctc) se encuentra totalmente conservado dentro del grupo de primates y parcialmente conservado entre otras especies de mamíferos. Este sitio resultó ser un atractivo y posible elemento funcional dado que se encuentra conservado (**Fig. 10**).

Con base en que la activación de la vía de NF- κ B puede ser inducida ante la exposición a diversos estímulos (tales como TNF) ⁵¹, realicé la búsqueda de datos en bases genómicas de acceso público que pudieran brindar información respecto a la relación entre XAF1 y NF- κ B. Con base en ello, extraje aquellos datos que incluyeran a XAF1 y a algún inductor de la vía de señalización de NF- κ B; este principio fue aplicado tanto para el programa GEO-NCBI, como para Oncomine.

En GEO-NCBI, se hallaron datos reportados donde se compararon los niveles de XAF1 en queratinocitos epidermales expuestos a TNF α contra queratinocitos epidermales expuestos a TNF α también pero en conjunto con un inhibidor de la vía de NF κ B: partenolide ⁵². Se observa que los niveles de XAF1 son menores cuando las células son expuestas a TNF α más el partenolide (**Fig. 11A**). Adicionalmente, otros datos reportados muestran que la expresión de XAF1 es mayor en células endoteliales al ser expuestas ante TNF α en comparación con el grupo celular que careció de dicha exposición (**Fig. 11B**). Estos resultados brindan una tendencia de la relación entre la expresión de XAF1 y NF- κ B, ya que se observa cómo los niveles de XAF1 aumentan ante la presencia de un inductor de NF- κ B (TNF α) y disminuyen ante este mismo inductor más el inhibidor de NF- κ B (TNF α junto con partenolide).

Finalmente, con OncoPrint, una base de datos genómicos de microarreglos de expresión procesados, se realizaron dos análisis de coexpresión que consistieron en la búsqueda de datos que contuvieran a XAF1 y a un gen involucrado en la vía de señalización de NFκB. En el primer hitmap se observa la comparación de la expresión de RNAm de XAF1 y TNFSF10 (también denominado TRAIL, un ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF) obtenido a partir de microarreglos de carcinoma colorrectal. Con estos datos se puede observar una relación entre XAF1 y TNFSF10 (Fig. 12A).

En el segundo hitmap se observan los resultados del análisis de coexpresión de RNAm para XAF1 y TRADD (una molécula adaptadora asociada al receptor TNF) a partir de microarreglos realizados en adenocarcinoma de colon. Se observa como los niveles de RNAm XAF1 aumentan o disminuyen a la par de los niveles de RNAm de TRADD (Fig. 12B). Estos resultados revelan una tendencia respecto a la posible relación directa entre XAF1 y NFκB.

```
>readseq-32060_tmp_1
(-1200)
gtttttcattcttgatattgacagactgccagagacagacaggagtgggtagtgagggt
cagaaggattaaggagcttgccctagccgatgaggaaggggaacaagataagatgcaaacct
cagtcctctgactctcagccaagtgctcactacccaactagctgtcaaagtgaggtggatg
gggccttggttaggtacatagacacctgagtcatatcaacctgggtgtgaatcccagctct
gatgttgagcgtattggcctagcctctctctgacctccattttctcttttttcatttcattt
ttcttttttgaggcagagtctcactctgtcactgacctctgttttccatagcaaaatggag
ttaataatgcttacatgagggattaaaacgaagacaatgctacctaattgcttagaatgg
tgccctggaacataggaacaatggtgaaacagctctttcattcttccctctatcactgtga
tcatcagtagcaccacacactgcttctcatttagtgctgaatttagagcctgcctgga
ggctggagcctgctggacatttcccttaattctgttatcctcctcagagagggcggcac
ccaccccatggcagacgccacgggaattctctgggcctgcttgtcatcactccagatgt
tgtttagagttcttctgttagcacagctgtttctagggctctggaaaaactctaaggacct
ccaggaggatacacaccagattgggtctgggctcacaccacctgcatcccagagcctc
cctggacgctgtttgcaaggtcctcaccgctggaagtccaggagccatttttagggaac
agcattcaagctcaacatggcaagttccctcttctcctgcaggggaggaccagaagggagc
cggagatgggggagaaggggtgggaggtggatggtttggaaaagggatggagaccagacg
gagagaagccagccagccaggggtgaggggaacaagctgctgtgctgccagggagaggcctg
gcctcaggctgccagcctcagggaggtagatgctggctgtgacagcagcaagaatgacgg
ccaagggcgacagcaggggctggccatgctgtaaaggggcttcttgggaggggtccagcct
caggaatcaaagggaactccctgagccgagaattctgaagatctcctccctccctgaagct
gtgggctgggcatcggaaaactttcagttttgtttccttgctgcaagaaacgaaactc
(0)
```

Figura. 8 Secuencia promotora de XAF1. Se muestran las -1200 pb correspondientes al promotor de XAF1. La región sombreada en gris representa las -600 pb previas al inicio de transcripción. La región sombreada en verde junto con la región gris corresponden a las -1200 pb previas al inicio de transcripción del gen XAF1. Las regiones sombreadas en amarillo muestran los sitios probables de unión del factor de transcripción NF-κB. La secuencia subrayada es la región que se encontró conservada en diversas especies de mamíferos.

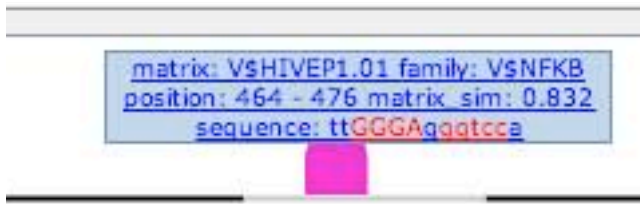
9A.

secuencia consenso 5' G G G R N W Y Y C C 3'
TESS 5' G G G G A A C T C C 3'
Genomatix 5' G G G A G G G T C C 3'
CHIP 5' G G G A A T T C C C 3'

9B. TESS

#	Factor	Model	Sequence
742_00000	NF-kappaB	J00061 (MA0061)	ggggaactcc

9C. GENOMATIX



9D. CHIP

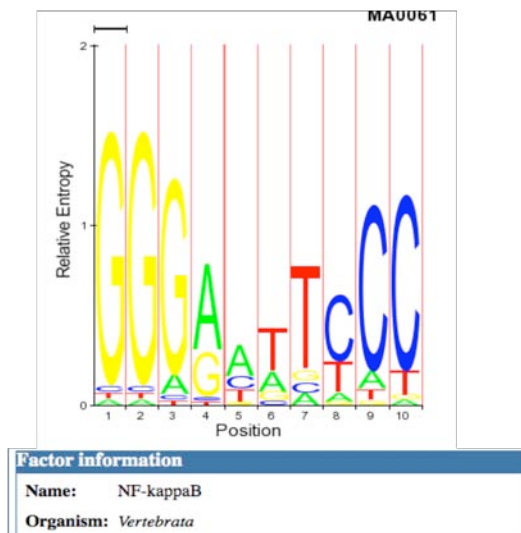


Figura 9. Sitios probables de unión del factor de transcripción NF- κ B. 9A. Se muestra la secuencia consenso que un dímeros de NF- κ B, conocida como sitios κ B, reportada por

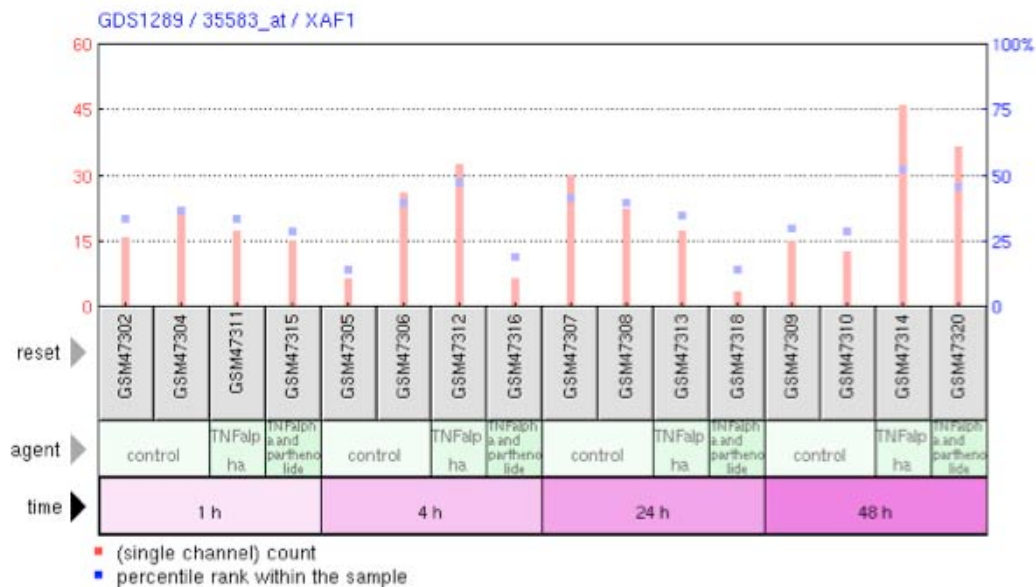
Hoffman *et al.*, 2006, comparada con las secuencias probables de unión a NF-κB de los programas utilizados. **9B.** Representación gráfica de los datos arrojados por TESS. **9C.** Representación gráfica de la secuencia teórica de unión a NF-κB que se determinó con ayuda de CHIP. **9D.** Representación gráfica del sitio de unión a NF-κB arrojado por Genomatix.

ENSEMBL



Figura 10. Alineamiento del sitio probable de unión a NF-κB. Se muestra la alineación de secuencias de diversas especies de mamíferos que contienen el sitio probable de unión a NF-κB, mismo que se encuentra enmarcado en rojo.

11A. GEO-NCBI



11B. GEO-NCBI

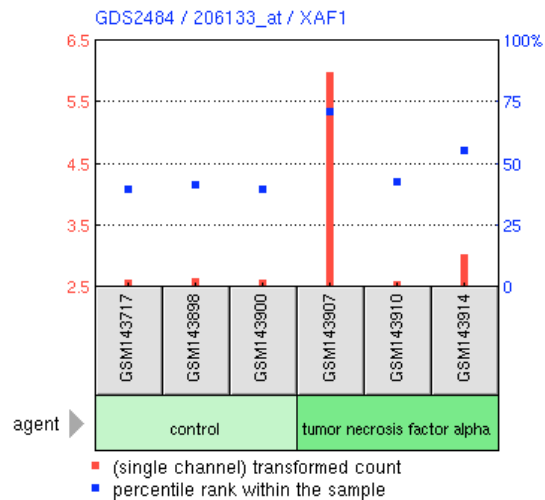
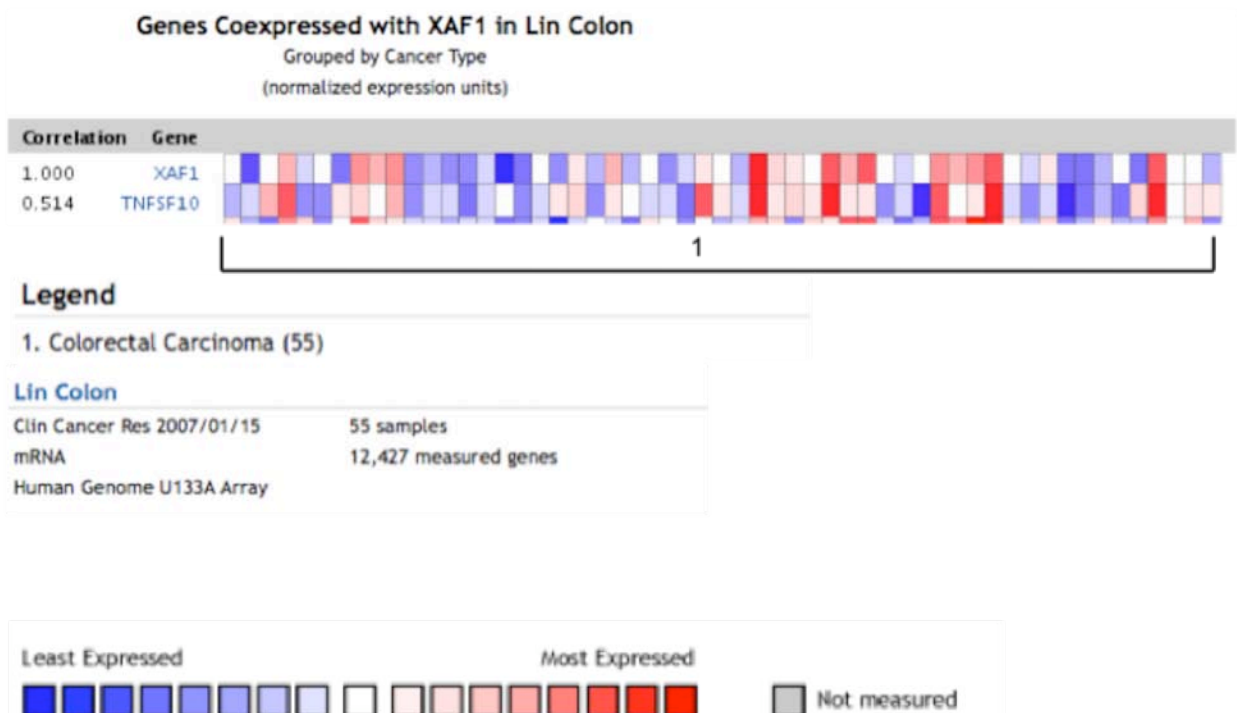


Figura 11. Datos obtenidos a partir de GEO NCBI. 11A Los niveles de XAF1 son mayores ante exposición con $TNF\alpha$ únicamente, en comparación con $TNF\alpha$ junto con partenolide (inhibidor de $NF\kappa B$). **11B** Se observan elevados los niveles de XAF1 ante el estímulo $TNF\alpha$, en comparación con el control que carece de dicho estímulo.

12A. ONCOMINE



12B. ONCOMINE

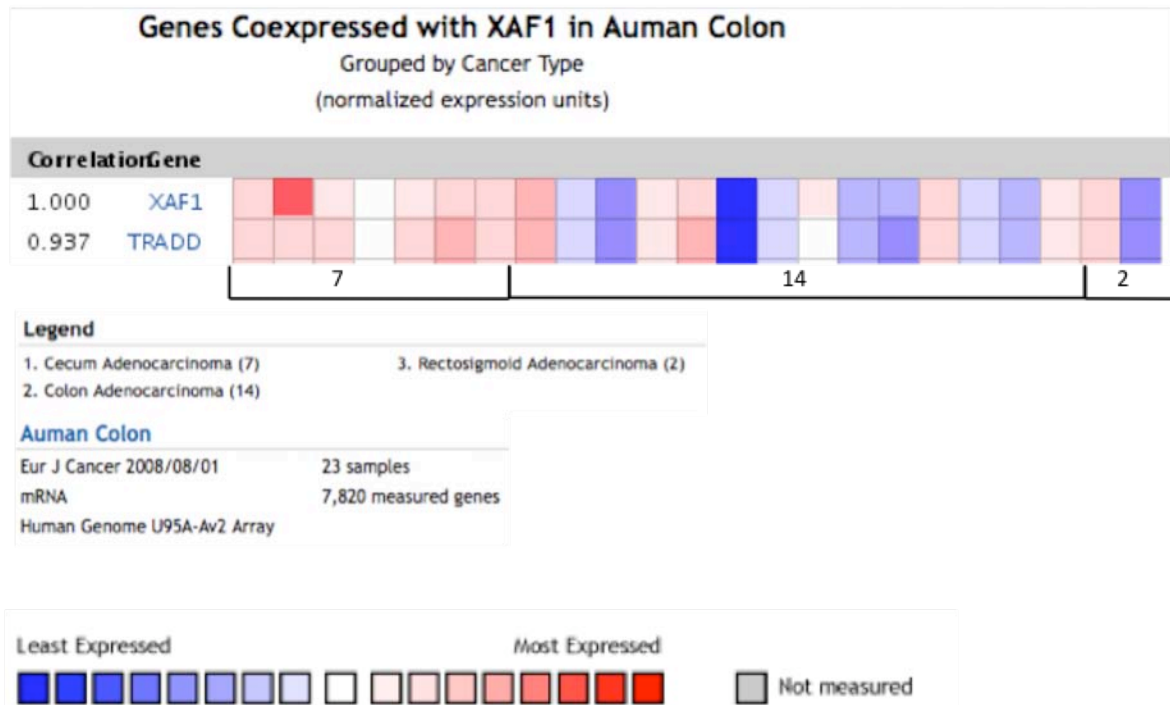


Figura 12. Datos obtenidos de Oncomine. Correlación entre la expresión de RNAm de XAF1 e inductores de la activación de NFκB. (**12A** : XAF1 y TNFSF10) (**12B** : XAF1 y TRADD). Se observa que los niveles de XAF1 coinciden con los niveles de los inductores de NFκB. Los colores azul y rojo representan el nivel de expresión; azul , menor nivel de expresión;rojo, mayor nivel de expresión.

2. Amplificación del promotor

Los fragmentos de la secuencia promotora de 600pb y 1200pb se amplificaron por PCR a partir de DNA genómico de sangre periférica, se utilizaron los oligonucleótidos y condiciones de amplificación mencionadas en métodos. El producto de amplificación se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, donde se observó una banda de aproximadamente 600 y 1200 pb respectivamente (**Fig. 13A – 13B**), mismas que coinciden con el tamaño esperado. Representación gráfica de los productos amplificados del promotor (**Fig. 13C**).

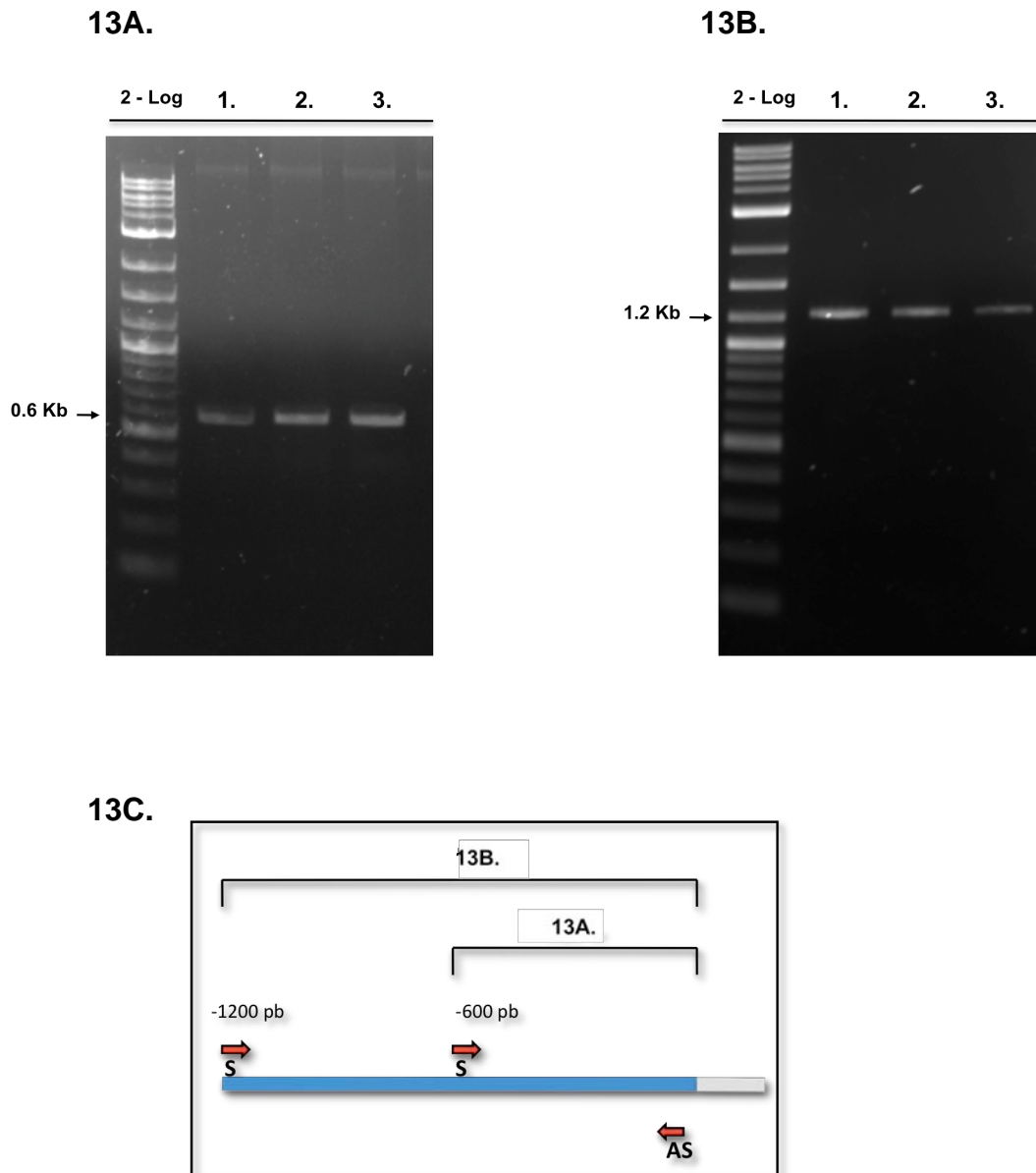


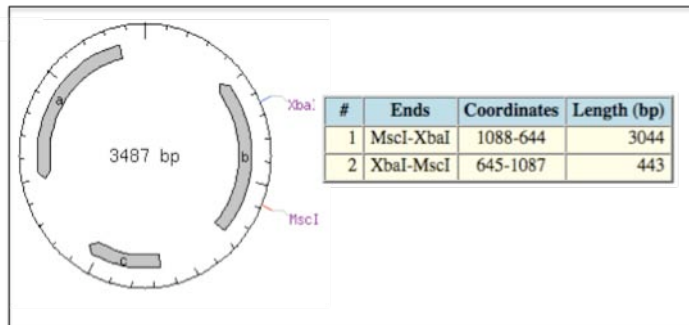
Figura 13. Amplificación de los productos de PCR. 13A. Se muestra la secuencia amplificada de 600 pb a 25, 30 y 35 ciclos respectivamente. **13B.** Se muestra la secuencia amplificada de 1200 pb a 35, 30 y 25 ciclos. **13C.** Representación gráfica de la amplificación de los productos de PCR.

3. Clonación en PTZ57/RT

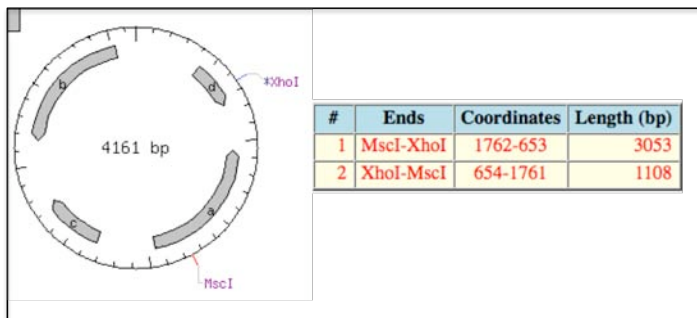
Se utilizó el programa NEBCutter para determinar los mapas de restricción a partir de la clonación *in silico* de PTZ57/RT con 600 (Fig. 14A) y 1200 pb (Fig. 14B) del promotor XAF1. Los fragmentos del promotor purificados se ligaron al vector, se transformaron células *E. coli* DH5 α , se seleccionaron colonias que presentaron color

blanco (α complementación) y se extrajo el DNA plasmídico por lisis alcalina. Para comprobar que el fragmento se hubiera insertado en el vector, el DNA plasmídico se sometió a digestión con las enzimas de restricción elegidas por el programa NEBCutter (**Fig. 14C**).

14A.



14B.



14C.

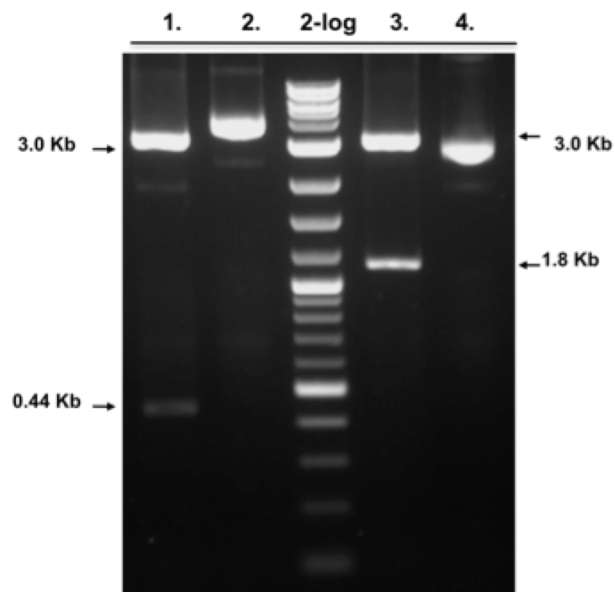


Figura 14. Análisis de restricción enzimática de PTZ57/RT. **14A.** Mapa con enzimas de restricción de la clonación *in silico* PTZ57/RT-Xaf 0 a 600 con Msc I y Xba I: 443 pb y 3044 pb longitud de los fragmentos. **14B.** Mapa con enzimas de restricción de la clonación *in silico* PTZ57/RT-Xaf 0 a 1200 con Msc I y Xho I: 1808 pb y 3051 pb la longitud de los fragmentos. **14C.** Electroferograma de la digestión enzimática del DNA plasmídico recombinante. Carril 1: productos de la digestión PTZ57/RT-Xaf600 con Msc I y Xba I, se observan los fragmentos esperados de 3.0 Kb y .44 Kb, carril 2: PTZ57/RT-Xaf600 no digerido, carril 3: productos de la digestión PTZ57/RT-Xaf 1200 con Msc I y Xho I, se observan los fragmentos esperados de 3.0 Kb y 1.8 Kb, carril 4: PTZ57/RT-Xaf1200.

4. Identificación del plásmido pSEAP2-basic

Para corroborar que se contaba con el vector pSEAP2-basic, se elaboró un mapa de restricción con el programa NEBcutter (**Fig. 15A**). Se digirió el vector con enzimas de restricción Bgl II y Bst XI, posteriormente el producto de digestión se corrió por electroforesis, en donde se observa el patrón esperado (**Fig 15B**).

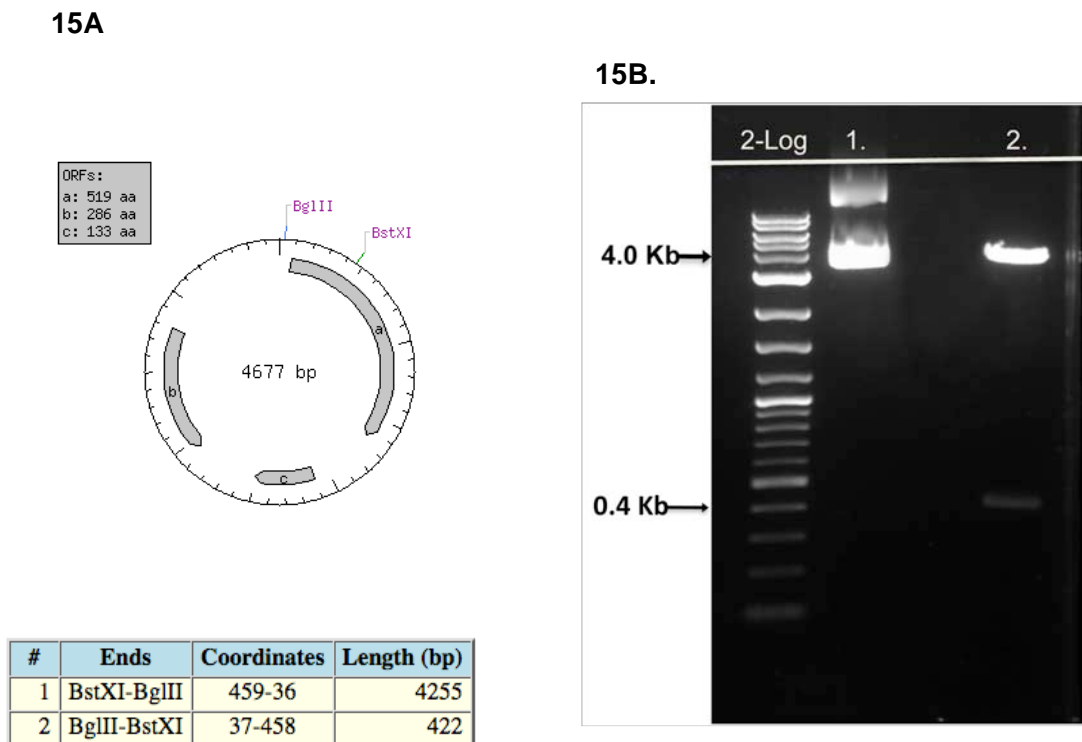


Figura 15. Análisis de restricción enzimática de pSEAP2-basic. **15A.** Mapa de pSEAP2-basic con enzimas de restricción Bgl II/Bst XI: 4255 pb y 422 pb longitud de los productos de la digestión. **15B.** Electroferograma de la digestión enzimática del vector pSEAP2-basic. Carril 1 :

plásmido no digerido, carril 3: plásmido digerido con Bgl II y Bst XI , se observan los fragmentos esperados de 4.0 y 0.4 Kb.

5. Identificación del plásmido pSEAP2-control

Para corroborar que se contaba con el vector pSEAP2-control, se elaboró un mapa de restricción con el programa NEBcutter (**Fig. 16A**). Se digirió el vector con enzimas de restricción y posteriormente se corrió por electroforesis para determinar el tamaño de los productos de la digestión (**Fig. 16B**).

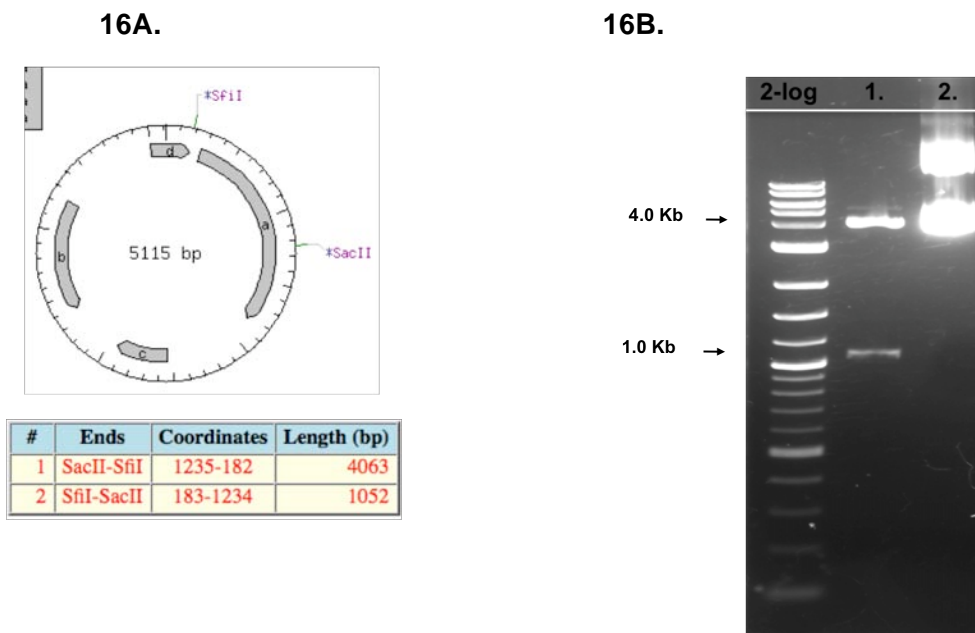


Figura 16. Análisis de restricción enzimática de pSEAP2-control. 16A. Mapa de pSEAP2-control con enzimas de restricción Sfi I y Sac II:4063 pb y 1052 pb longitud de los fragmentos. **16B.** Patrón de la digestión de pSEAP-control. Carril 1: con Sfi I y Sac II, se observan los fragmentos del tamaño esperado (4.0 y 1.0 Kb), carril 2: plásmido pSEAP2-control sin digerir.

6. Digestiones de plásmidos pSEAP2-basic y pSEAP2-control.

Una vez que verificado que se contaba con los vectores correctos, se transformaron células *E. coli* DH5 α con los plásmidos, de forma independiente, se seleccionaron y crecieron colonias y se purificó el DNA plasmídico por lisis alcalina a gran escala. Los plásmidos se digirieron con las enzimas de restricción anteriormente mencionadas (**Fig. 17**).

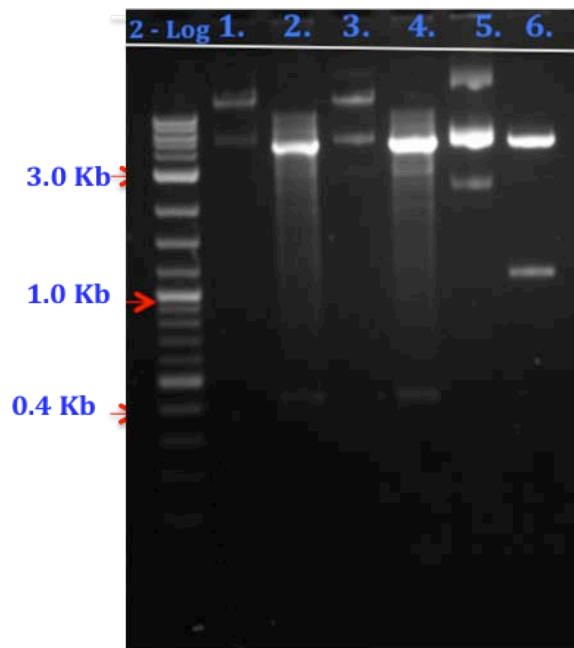


Figura 17. Patrón de digestión de vectores pSEAP2. Carril 1: pSEAP2-basic no digerido, carril 2: pSEAP2-basic digerido con Bgl II y Bst XI, se observan los fragmentos esperados de 4255 pb y 422 pb, carril 3: pSEAP2-basic no digerido, carril 4: pSEAP2-basic digerido con Bgl II+ Bst XI, se observan los fragmentos esperados de 4255pb y 422 pb, carril 5: pSEAP2-control no digerido, carril 6: pSEAP2-control digerido con Sfi I y Sac II, se observan los fragmentos esperados de 4063 y1052pb.

7. Apertura del vector pSEAP-basic.

El vector pSEAP-basic fue abierto con el fin de poder insertar el fragmento del promotor de 600 y 1200, de manera independiente, dentro de la secuencia del vector, con las mismas enzimas de restricción con las que se digirieron dichos productos a clonar. El vector linearizado se corrió por electroforesis antes (**Fig. 18A**) y después de ser purificado por gel (**Fig. 18B**).

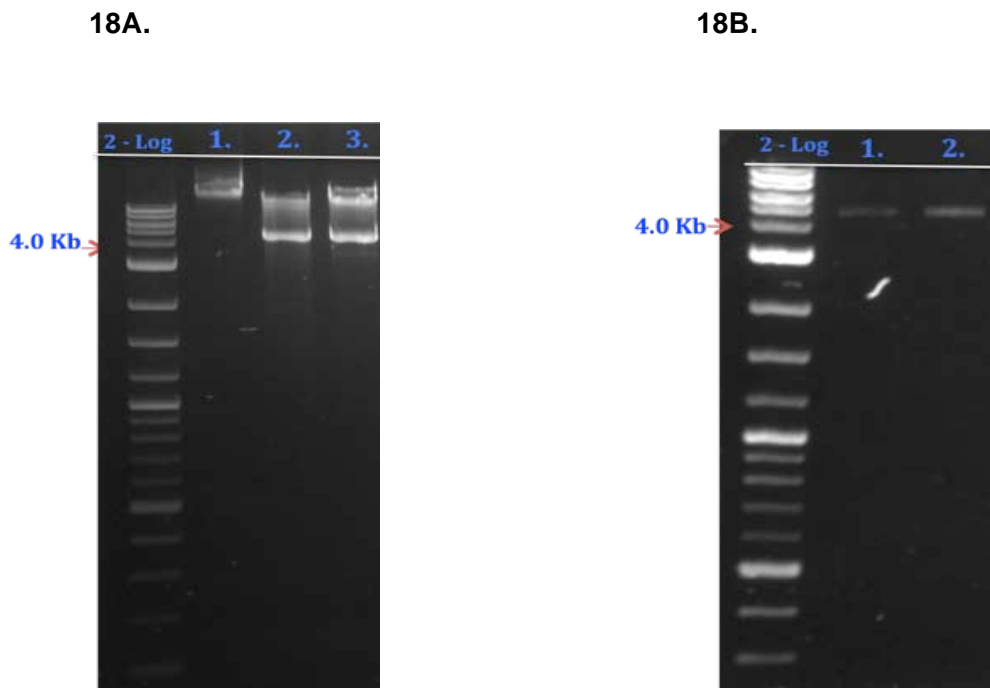
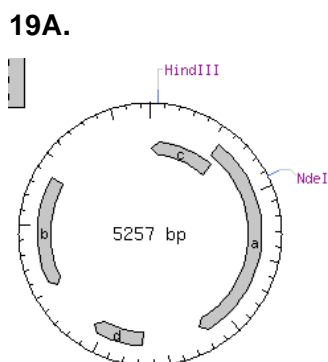


Figura 18. Electroforesis del vector abierto pSEAP2-basic. **18A.** Linearización de pSEAP2-basic. Carril 1: plásmido no digerido, carril 2: digestión con Nru I y Hind III para 600 pb, carril 3: digestión con Xho I y Nru I para 1200 pb **18B.** Se muestran los plásmidos linearizados y purificados. En ambos paneles se observa la longitud del vector 4.7 kB.

8. Clonación de la secuencia promotora de XAF 600 en el vector pSEAP2-basic.

Se realizó la clonación *in silico* del fragmento XAF 600 en el vector pSEAP2-basic, así como el mapa con enzimas de restricción para verificar la clonación (**Fig.19A**). Una vez liberado el fragmento XAF 600 del PTZ57/RT, se clonó en pSEAP2 basic. Posteriormente se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α , se seleccionaron y amplificaron colonias, por último, se extrajo el DNA plasmídico y fue digerido para verificar la inserción del fragmento al vector (**Fig 19B**).



#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	NdeI-HindIII	936-53	4375
2	HindIII-NdeI	54-935	882

19B.

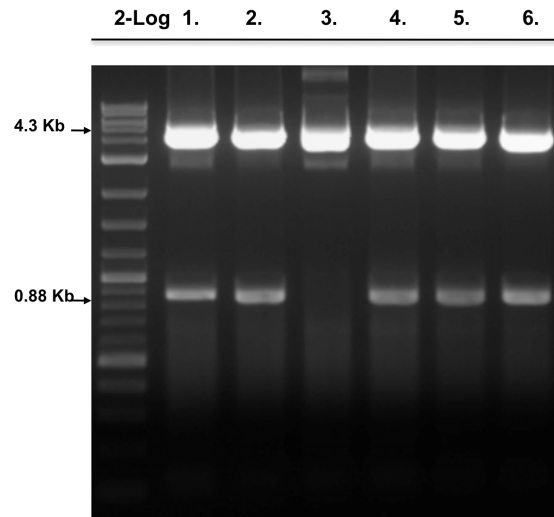
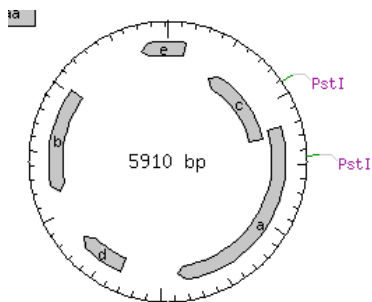


Figura 19. Clonación pSEAP2basic/XAF600. 19A. Mapa con enzimas de restricción de la clonación *in silico* pSEAP2-basic / XAF600 con Hind III y Nde I: 882 y 4375 pb la longitud de los fragmentos. 19B. Electroferograma de la digestión enzimática de la clonación pSEAP2-basic / XAF600, se observan los fragmentos esperados de 0.88 y 4.3 Kb .

9. Clonación de la secuencia promotora de XAF 1200 en el vector pSEAP2-basic.

Se realizó la clonación *in silico* del fragmento XAF 1200 en el vector pSEAP2-basic, así como el mapa con enzimas de restricción para verificar la clonación (**Fig. 20A**). Se realizó la digestión del plásmido extraído (**Fig. 20B**).

20A.



#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	PstI-PstI	1444-917	5384
2	PstI-PstI	918-1443	526

20B.

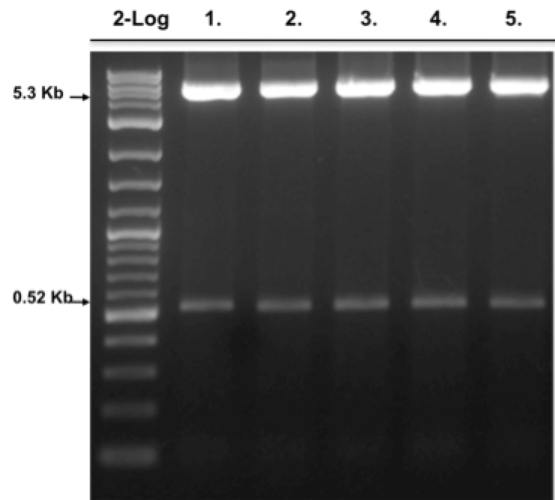
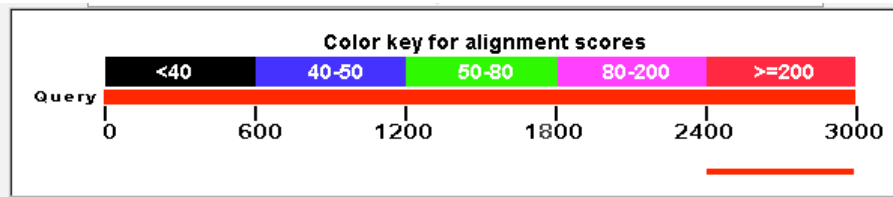


Figura 20. Clonación pSEAP2basic/XAF1200. 20A. Mapa con enzimas de restricción de la clonación *in silico* pSEAP2-basic / XAF1200 con Pst I: 526 y 5384 pb la longitud de los fragmentos generados. **20B.** Patrón de la digestión enzimática de la clonación pSEAP2-basic / XAF1200, se observan los fragmentos esperados de 0.52 y 5.3 Kb.

10. Secuenciación de los fragmentos del promotor clonados en pSEAP2-basic

La determinación de la secuencia nucleotídica de las clonaciones se realizó por métodos automatizados, se utilizaron los oligonucleótidos universales sentido y antisentido. Posteriormente se alineó la secuencia promotora de XAF1 descargada de TRED con las secuencias de la clonaciones arrojada por el secuenciador Applied Biosystems del INMEGEN para pSEAP2basic/XAF600 con el fin de verificar la correcta inserción (**Fig. 21A**). Asimismo las secuencias se analizaron comparándolas con la base de datos de Genbank para corroborar la identidad del fragmento clonado (**Fig. 21B**). De igual forma se realizó dicha alineación con la secuencia promotora de XAF1 para pSEAP2basic/XAF1200 (**Fig. 21C**), y la respectiva comparación con la base de datos de Genbank (**Fig. 21D**). Se puede observar que la alineación de las secuencias corresponde a una identidad del 99%.

21A. XAF600



Features flanking this part of subject sequence:
[42131 bp at 5' side: solute carrier family 13, member 5 isoform b](#)
[27 bp at 3' side: XIAP associated factor 1 isoform 1](#)

21B. XAF600

Score = 1077 bits (583), Expect = 0.0
 Identities = 587/589 (99%), Gaps = 0/589 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1      CTTCTGTAGCACAGCTGTTTCTAGGGTCTGGAAAACTCTAAGGACCCCGAGGAGATA 60
Sbjct 6262157 CTTCTGTAGCACAGCTGTTTCTAGGGTCTGGAAAACTCTAAGGACCCCGAGGAGATA 6262216

Query 61     CACACCAGATTGGGTCCTGGGCTCACACCACCCTGCATCCCCAGAGCCCTCCCTGGACGCTG 120
Sbjct 6262217 CACACCAGATTGGGTCCTGGGCTCACACCACCCTGCATCCCCAGAGCCCTCCCTGGACGCTG 6262276

Query 121    TTTGCAAGTCTCTCACCGCCTGGAAAGTTCAGGAGCCATTTTATAGGGAACAGCATTCAAGC 180
Sbjct 6262277 TTTGCAAGTCTCTCACCGCCTGGAAAGTTCAGGAGCCATTTTATAGGGAACAGCATTCAAGC 6262336

Query 181    TCAACATGGCAAGTTCCTCTTTCTGCGAGGGGAGGACCAGAAGGGAGCCGGAGATGGGG 240
Sbjct 6262337 TCAACATGGCAAGTTCCTCTTTCTGCGAGGGGAGGACCAGAAGGGAGCCGGAGATGGGG 6262396

Query 241    GAGAAGGGTGGGAGGTGGATGGTTTGGAAAAGGGATGGAGACCAGACGGAGAGAAGTCA 300
Sbjct 6262397 GAGAAGGGTGGGAGGTGGATGGTTTGGAAAAGGGATGGAGACCAGACGGAGAGAAGCCA 6262456

Query 301    GCCAGCCAGGGTGAAGGAACAAGCTGCTGTGCTGCCAGGAGAGCCCTGGCCCTCAGGCTG 360
Sbjct 6262457 GCCAGCCAGGGTGAAGGAACAAGCTGCTGTGCTGCCAGGAGAGCCCTGGCCCTCAGGCTG 6262516

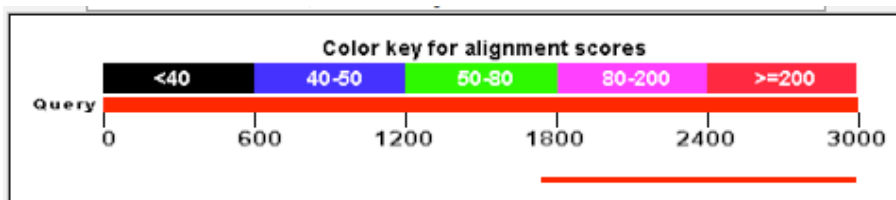
Query 361    CCAGCCTCAGGGAGGTAGATGCGGCTGTGACAGCAGCAAGAATGACGGCCAAAGGGCGAC 420
Sbjct 6262517 CCAGCCTCAGGGAGGTAGATGCGGCTGTGACAGCAGCAAGAATGACGGCCAAAGGGCGAC 6262576

Query 421    AGCAGGGGCTGGCCATGCTGTAAGGGGCTTCTTGGGAGGGTCCAGCCTCAGGAATCAAG 480
Sbjct 6262577 AGCAGGGGCTGGCCATGCTGTAAGGGGCTTCTTGGGAGGGTCCAGCCTCAGGAATCAAG 6262636

Query 481    GGGAACTCCTGAGCCGAGAATCTGAAGATCTCTCCCTCCCTGAAGCTGTGGGCTGGGC 540
Sbjct 6262637 GGGAACTCCTGAGCCGAGAATCTGAAGATCTCTCCCTCCCTGAAGCTGTGGGCTGGGC 6262696

Query 541    CATCGGAAAACCTTCAGTTTTGTTTCCCTTGCCCTGCAAGAAACGAAAACTC 589
Sbjct 6262697 CATCGGAAAACCTTCAGTTTTGTTTCCCTTGCCCTGCAAGAAACGAAAACTC 6262745
  
```

21C. XAF1200



Features flanking this part of subject sequence:
[41468 bp at 5' side: solute carrier family 13, member 5 isoform b](#)
[27 bp at 3' side: XIAP associated factor 1 isoform 1](#)

21D. XAF1200

Score = 2298 bits (1244), Expect = 0.0
 Identities = 1249/1252 (99%), Gaps = 0/1252 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1 TTCTNGATATTGACAGACTGCCAGAGACAGACAGGAGTGGGTAGTGAGGGTCAGAAGGA 60
Sbjct 6261494 TTCTTGATATTGACAGACTGCCAGAGACAGACAGGAGTGGGTAGTGAGGGTCAGAAGGA 6261553
Query 61 TTAAGGAGCTTGCCTAGCCGATGAGGAAGGGAACAAGATAAGATGCAAACCTCAGTCTCT 120
Sbjct 6261554 TTAAGGAGCTTGCCTAGCCGATGAGGAAGGGAACAAGATAAGATGCAAACCTCAGTCTCT 6261613
Query 121 GACTCTCAGCCAAGTGCTCACTACCCCACTAGCTGTCAAATGAGGTGGATGGGGCCTTG 180
Sbjct 6261614 GACTCTCAGCCAAGTGCTCACTACCCCACTAGCTGTCAAATGAGGTGGATGGGGCCTTG 6261673
Query 181 GTTAGGTACATAGACACCTGAGTCATATCAACCTGGTGTGAATCCAGCTCTGATGTTGA 240
Sbjct 6261674 GTTAGGTACATAGACACCTGAGTCATATCAACCTGGTGTGAATCCAGCTCTGATGTTGA 6261733
Query 241 GCGATTGGCCTAGCCTCTCTCTGCCCTCCATTTTCTCTTTTTTTCATTTCTTTT 300
Sbjct 6261734 GCGATTGGCCTAGCCTCTCTCTGCCCTCCATTTTCTCTTTTTTTCATTTCTTTT 6261793
Query 301 TGAGGCAGAGTCTCACTCTGTCACTGCCTCTGTTTTCCATAGCAAAATGGAGTTAATAAT 360
Sbjct 6261794 TGAGGCAGAGTCTCACTCTGTCACTGCCTCTGTTTTCCATAGCAAAATGGAGTTAATAAT 6261853
Query 361 GCTTACATGAGGGATTAAAACGAAGACAATGCCTACCTAATGCTTAGAATGGTGCCTGGA 420
Sbjct 6261854 GCTTACATGAGGGATTAAAACGAAGACAATGCCTACCTAATGCTTAGAATGGTGCCTGGA 6261913
Query 421 ACATAGGAACAATGTTGAAACAGTCTTTCATTTCTCCCTCCTATCACTGTGATCATCAGT 480
Sbjct 6261914 ACATAGGAACAATGTTGAAACAGTCTTTCATTTCTCCCTCCTATCACTGTGATCATCAGT 6261973
Query 481 ACCACCACACACTGCTTCTCATTTAGTGCCTGAATTTTAGAGCCTGCCTGGAGGCTGGAG 540
Sbjct 6261974 ACCACCACACACTGCTTCTCATTTAGTGCCTGAATTTTAGAGCCTGCCTGGAGGCTGGAG 6262033
Query 541 CCCTGCCTGGACATTTCCCTTAATCTTGTATCCTCCTCAGAGAGGCGGCACCCACCCCA 600
Sbjct 6262034 CCCTGCCTGGACATTTCCCTTAATCTTGTATCCTCCTCAGAGAGGCGGCACCCACCCCA 6262093
Query 601 TTGGCAGACGCCACGGGAATTCCTGGGCTGCTTGTCACTCCAGATGTTGTTTAGA 660
Sbjct 6262094 TTGGCAGACGCCACGGGAATTCCTGGGCTGCTTGTCACTCCAGATGTTGTTTAGA 6262153
Query 661 GTTCTTCTGTTAGCACAGCTGTTTCTAGGGTCTGGAAAACTCTAAGGACCCCGAGGAG 720
Sbjct 6262154 GTTCTTCTGTTAGCACAGCTGTTTCTAGGGTCTGGAAAACTCTAAGGACCCCGAGGAG 6262213
Query 721 ATACACACCAGATTGGGCTGCGGCTCACACCACCTGCATCCCAGAGCCTCCCTGGACG 780
Sbjct 6262214 ATACACACCAGATTGGGCTGCGGCTCACACCACCTGCATCCCAGAGCCTCCCTGGACG 6262273
Query 781 CTGTTTGCAAGTCTCACCGCTGGAAGTCCAGGAGCCATTTTGGGAAACAGCATTCA 840
Sbjct 6262274 CTGTTTGCAAGTCTCACCGCTGGAAGTCCAGGAGCCATTTTGGGAAACAGCATTCA 6262333
Query 841 AGCTCAACATGGCAAGTTCCCTCTTTCTGTCAGGGGAGGACCAGAAGGGAGCCGGAGATG 900
Sbjct 6262334 AGCTCAACATGGCAAGTTCCCTCTTTCTGTCAGGGGAGGACCAGAAGGGAGCCGGAGATG 6262393
Query 901 GGGGAGAAGGGTGGGAGGTGGATGGTTTGGAAAAGGGATGGAGACCCAGACGGAGAGAAG 960
Sbjct 6262394 GGGGAGAAGGGTGGGAGGTGGATGGTTTGGAAAAGGGATGGAGACCCAGACGGAGAGAAG 6262453
Query 961 CCAGCCAGCCAGGGTGGGGAACAAGCTGCTGTGCTGCCAGGAGAGGCTGGCCTCAGG 1020
Sbjct 6262454 CCAGCCAGCCAGGGTGGGGAACAAGCTGCTGTGCTGCCAGGAGAGGCTGGCCTCAGG 6262513
Query 1021 CTGCCACCCTCAGGGAGGTAGATGCGGCTGTGACAGCAGCAAAGAATGACGGCCAAGGGC 1080
Sbjct 6262514 CTGCCAGCCTCAGGGAGGTAGATGCGGCTGTGACAGCAGCAAAGAATGACGGCCAAGGGC 6262573
Query 1081 GACAGCAGGGGCTGGCCATGCTGTAAGGGGCTTCTTGGGAGGTCAGCCTCAGGAATC 1140
Sbjct 6262574 GACAGCAGGGGCTGGCCATGCTGTAAGGGGCTTCTTGGGAGGTCAGCCTCAGGAATC 6262633
Query 1141 AAGGGGAACCTCTGAGCCGAGAATTCGAAGATCTCCTCCCTCCCTGAAGCTGTGGGCTG 1200
Sbjct 6262634 AAGGGGAACCTCTGAGCCGAGAATTCGAAGATCTCCTCCCTCCCTGAAGCTGTGGGCTG 6262693
Query 1201 GGCCGTCGGAAAACTTTCAGTTTTGTTTCTTGCCTGCAAGAAACGAAACTC 1252
Sbjct 6262694 GGCCATCGAAAACTTTCAGTTTTGTTTCTTGCCTGCAAGAAACGAAACTC 6262745

```

Figura 21. Resultados de la secuenciación. Datos obtenidos a partir de la secuenciación y análisis con BLAST en comparación con secuencias de Genbank . **21A.** Representación gráfica

de la alineación de la secuencia promotora de XAF1 descargada de TRED (Query) con la secuenciación automatizada de pSEAP2basic/XAF600. **21B.** Alineamiento de la secuencia obtenida por método automatizado comparada con la base de datos BLAST para XAF600. **21C.** Representación gráfica de la alineación de la secuencia promotora teórica de XAF1 con la secuenciación automatizada de pSEAP2basic/XAF1200. **21D.** Alineamiento de la secuencia obtenida por método automatizado comparada con la base de datos BLAST para XAF1200.

VI. Discusión

La regulación de la expresión génica es fundamental en procesos biológicos como la apoptosis. Dicha regulación implica múltiples eventos como el control transcripcional. La interacción entre factores de transcripción y sus sitios de reconocimiento del DNA es determinante para el control de la expresión de genes³³.

El gen XAF1 está implicado en la supresión de la actividad de XIAP, un potente miembro de la familia de las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs)¹³. Por lo tanto, al ser XAF1 un antagonista de la actividad anticaspasa de XIAP, resulta importante en la disminución del umbral apoptótico en células cancerosas¹⁸.

Anteriormente se había reportado un estudio relacionado con la pérdida de heterocigocidad en cáncer colorrectal de los cromosomas humanos, en donde se observó que el brazo p del cromosoma 17, seguido del brazo q del cromosoma 18, fueron los que tuvieron el mayor porcentaje de deleciones alélicas, este dato sugirió que dichos brazos cromosómicos contienen genes supresores de tumores que también sufren pérdida de heterocigocidad⁵³. Estudios posteriores determinaron que la localización del gen XAF1 es precisamente la región 17p13.2¹⁶.

Adicionalmente la expresión de XAF1 se ha observado reducida en líneas celulares cancerosas así como en tejido tumoral, en comparación con células y tejido sano^{16, 18, 22, 24}. También se ha observado que la expresión de XAF1 puede inducir la regresión tumoral en modelos *in vivo*²². Todos estos datos sugieren al gen XAF1 como un supresor de tumores, por lo que resulta muy importante el estudio de su regulación transcripcional.

Recientemente se reportó que NF- κ B activaba la transcripción de XAF1 ante tratamiento con TNF α , dado que la expresión de XAF1 disminuyó considerablemente ante la presencia de un inhibidor de NF- κ B. Sin embargo, se sugiere que factores de transcripción adicionales deben de estar involucrados en la regulación transcripcional de XAF1 dado que su expresión no fue inhibida por completo⁴¹. Estos resultados han dado la pauta para profundizar en estudios relacionados con los mecanismos moleculares donde NF- κ B podría regular la transcripción de XAF1.

En este trabajo se realizó la búsqueda *in silico* de sitios probables de unión del factor de transcripción NF- κ B dentro de la secuencia promotora de XAF1. Se identificaron tres sitios teóricos de unión de NF- κ B dentro de las primeras -1200 pb del promotor de XAF1. Los dos primeros se localizan en las primeras -600 pb y la tercera en las subsecuentes -600 pb de la secuencia promotora. La primera secuencia

(5' **ggggaactcc** 3') fue identificada con el programa TESS. El segundo sitio probable (5' **gggaggggtcc** 3') fue hallado con el programa Genomatix. La tercera secuencia (5' **gggaattctc** 3') se encontró mediante la herramienta bioinformática CHIP. De estos tres sitios hallados, la secuencia 5' **gggaattctc** 3' resultó ser particularmente atractiva como un posible elemento funcional, ya que después de haber realizado un alineamiento de la secuencia promotora del gen XAF1 con diversas especies de mamíferos, se observó que dicho sitio se encuentra conservado. Dentro del grupo de primates (*Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla* y *Pongo pygmaeus*), dicha secuencia estaba conservada en su totalidad, sin embargo en el resto del grupo mamíferos (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Bos taurus*, y *Equus caballus*) este sitio se encontraba conservado parcialmente. El hecho de que el sitio se encuentre conservado puede significar que dichas secuencias sean homólogas y por lo tanto podrían tener una función importante dentro de dichos organismos, es por esta razón que se ha mantenido conservado en distintos organismos.

NF- κ B consiste en una familia de proteínas reguladoras transcripcionales que se unen a un gran número de secuencias blanco degeneradas para regular la expresión de cientos de genes de forma dinámica y precisa en respuesta a los cambios ambientales ⁴⁴. Las regiones regulatorias de genes dependientes de NF κ B están basadas en diferentes sitios de unión para lograr un control transcripcional apropiado, mismo que es tejido y estímulo específico ⁴⁴. Los dímeros de NF- κ B se unen a los sitios κ B, la secuencia consenso de unión comúnmente reportada, está conformada por: 5' -GGGRNWYYCC -3'; en donde R denota A o G; N representa cualquier nucleótido; W representa A o T; e Y equivale a C o a T. Las secuencias encontradas por los programas para predecir sitios de unión a NF κ B se encuentran dentro de los parámetros de la secuencia consenso reportada por Chen y Ghosh; 1999; aunque con ciertas variaciones. Por ejemplo, la secuencia 5' **gggaattctc** 3' presenta un cambio de nucleótido en la segunda posición del extremo 3' (C→T) . Así como la secuencia 5' **gggaggggtcc** 3' presenta dos cambios de pares de bases en la cuarta y quinta posición del extremo 3' (Y→G) y (W→G), con respecto a la secuencia consenso reportada ⁴⁸. Esto podría explicarse a que existen varios complejos DNA/NF κ B que incluyen una gran variedad de secuencias de sitios κ B ^{48, 54}.

Por otro lado, se realizaron estudios predictivos mediante programas bioinformáticos que pudieran brindar un acercamiento hipotético respecto a la relación entre XAF1 y NF- κ B, ya que anteriormente se ha reportado que TNF α induce la

expresión de NF- κ B⁵⁵. En los datos obtenidos a partir del GEO-NCBI, el cual proporciona datos públicos de genómica funcional, se pudo apreciar una tendencia respecto a la relación entre XAF1 y NF- κ B; ya que elevados niveles de XAF1 correlacionan con altos niveles de TNF α . Estos datos revelan una posible relación indirecta entre XAF1 y NF- κ B.

Asimismo, mediante el programa OncoPrint, fue posible realizar una comparación de la expresión de múltiples genes y estimar las relaciones entre éstos, por lo tanto al utilizar la base de datos de microarreglos (Human Genome U133A Array) fue posible comparar la expresión de XAF1 y TNFSF10 (también conocido como TRAIL). TNFSF10 es un miembro de la familia TNF, se ha reportado que es capaz de inducir la activación de NF κ B⁵⁵. La comparación de expresión se realizó en cincuenta y cinco muestras de carcinoma colorrectal en donde la expresión de RNAm de XAF1 y de TNFSF10 es directamente proporcional. Adicionalmente, se comparó la expresión de RNAm de XAF1 con TRADD, la cual es una proteína adaptadora que interactúa con TNFR1 y que interviene en la activación de NF κ B⁵⁶. Para dicha comparación se tomaron datos de microarreglos (Human Genome U95A Av2) disponibles en OncoPrint de veintitrés muestras de adenocarcinoma; en donde se observó que la expresión de ambos genes se comportaba de manera similar en este padecimiento, estos datos podrían sugerir que NF κ B podría también estar implicado en la activación de XAF1.

Los análisis *in silico* ayudaron a determinar la longitud de los fragmentos del promotor a clonar para posteriormente realizar ensayos de actividad transcripcional con NF κ B. Una vez que se determinó la longitud de los fragmentos del promotor a clonar, se amplificaron los productos de PCR de XAF600 y XAF1200 con sus respectivos oligonucleótidos para posteriormente ser clonados por separado en el vector pTZRT/57. Una vez verificada la inserción en este vector por restricción enzimática, se digirió el plásmido para liberar el producto con extremos cohesivos y de este modo favorecer la correcta inserción dentro del sitio múltiple de clonación (MCS) del vector de expresión pSEAP2-basic previamente abierto. Para corroborar la construcción de estos plásmidos, se realizó el análisis electroforético de la restricción enzimática de ambas construcciones. Se obtuvieron la longitud de los fragmentos esperados, tanto para XAF600: 4375 y 882 pb, así como para XAF1200: 5384 y 526 pb. Adicionalmente, para confirmar la correcta inserción e identidad de los fragmentos del promotor clonados, se realizó la secuenciación automatizada con los

oligonucleótidos sentido y antisentido. Las secuencias obtenidas a partir de dicho método automatizado, fueron alineadas con la secuencia promotora teórica de XAF1, así como con la base de datos de BLAST. El alineamiento confirmó la identidad de las secuencias y asimismo la adecuada inserción del promotor al vector pSEAP2-basic. Estos resultados confirmaron que se obtuvieron las clonaciones de forma correcta, tanto de pSEAP2-basic/XAF600 como de pSEAP2-basic/XAF1200. Finalmente, se extrajo el DNA plasmídico para ser transfectado posteriormente y de esta forma poder analizar la regulación del promotor de XAF1 a nivel transcripcional ante inductores de NF- κ B.

VII. Conclusiones

- Se localizaron tres sitios probables dentro de la secuencia promotora de XAF1. Dos de ellos se encontraron en las primeras 600 pb del promotor y el tercero en las subsecuentes 600 pb.
- Se encontró conservado el sitio 5'gggaattctc 3' dentro del grupo de primates, por lo que resultó ser un sitio hipotéticamente funcional de unión al factor de transcripción NFκB.
- Se realizaron las clonaciones de las primeras 600 pb y 1200 pb del promotor de XAF1 en el vector de expresión pSEAP2-basic.
- Se observó con la ayuda de programas bioinformáticos como Oncomine y GEO-NCBI una tendencia respecto a la posible relación entre XAF1 y NFκB; por lo tanto, es posible concluir que NFκB es un factor de transcripción atractivo para regular a nivel transcripcional a XAF1.

VIII. Perspectivas

Este trabajo representa un primer acercamiento para poder profundizar en estudios relacionados con la transcripción de XAF1. Las clonaciones realizadas con el promotor de XAF1 servirán para realizar futuros ensayos funcionales *in vitro*, en donde se analice de manera experimental la transcripción de la secuencia promotora de este gen. Un segundo acercamiento consistiría en realizar transfecciones con estas construcciones, considerando como factor de transcripción a NF κ B, al inducir su activación mediante estímulos como TNF α .

Por otro lado, el promotor de XAF1 presenta posibles elementos regulatorios para otros factores de transcripción diferentes a NF- κ B, por lo tanto estas clonaciones también pueden ser empleadas para probar otros factores de transcripción que tengan sitios de reconocimiento dentro del promotor de XAF1 como por ejemplo YY1 o GATA1. Del mismo modo pueden servir para realizar clonaciones de fragmentos más extensos con la secuencia promotora de XAF1.

IX. Glosario

- **Análisis *In silico***

Estudio realizado a través del empleo de herramientas informáticas con el fin de simular procesos naturales o de laboratorio. El término "*in silico*" significa hecho por computadora o vía simulación computacional, está acuñada a partir de las frases *in vitro* e *in vivo*, no obstante, no significa nada en latín.

- **Factor de transcripción**

Proteína que participa en la regulación de la transcripción del DNA, pero que no forma parte de la RNA polimerasa. Pueden actuar al reconocer y unirse a secuencias concretas de DNA, a otros factores o directamente a la RNA polimerasa.

- ***In Vitro***

Se refiere a una técnica para realizar un determinado experimento en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo. *In vitro* proviene del latín y significa dentro del vidrio.

- **Promotor**

Secuencia determinada de DNA que controla la iniciación de la transcripción del RNAm como producto de ese gen.

- **α -Complementación**

Técnica molecular que permite la detección de ligaciones exitosas en vectores de clonación génica. Si la ligación fue exitosa, la colonia bacteriana es blanca si no es azul. Las colonias azules corresponden a las células transformadas con el vector que lleva el gen de la β -galactosidasa funcional y produce por inducción con IPTG dicha enzima capaz de hidrolizar al X-Gal y generar color azul. Las colonias blancas corresponden a las células transformadas con el vector que lleva un gen de la β -galactosidasa no funcional por inserción de un fragmento de DNA dentro del mismo.

- **Etopósido**

Agente antineoplásico, ejerce sus efectos antitumorales al inhibir a la topoisomerasa II, lo cual resulta en rompimientos dejados sin reparar en el ADN.

X. Referencia Bibliográfica

1. Granados M., H.A. Manual de Oncología (2003).
2. Weinberg, R.A. The biology of cancer (New York, 2007).
3. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
4. Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. & Mantovani, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* **30**, 1073-81 (2009).
5. Fesik, S.W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* **5**, 876-85 (2005).
6. Ameisen, J.C. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ* **9**, 367-93 (2002).
7. Elinos-Báez C.E., M.V., Meléndez Z.J. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gac Med Mex* **139**, 493-500 (2003).
8. Hunter, A.M., LaCasse, E.C. & Korneluk, R.G. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* **12**, 1543-68 (2007).
9. Martínez-Ruiz, G., Maldonado, V., Ceballos-Cancino, G., Grajeda, J.P. & Melendez-Zajgla, J. Role of Smac/DIABLO in cancer progression. *J Exp Clin Cancer Res* **27**, 48 (2008).
10. Lowe, S.W. & Lin, A.W. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* **21**, 485-95 (2000).
11. LaCasse, E.C. et al. IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* **27**, 6252-75 (2008).
12. LaCasse, E.C., Baird, S., Korneluk, R.G. & MacKenzie, A.E. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* **17**, 3247-59 (1998).
13. Liston, P. et al. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat Cell Biol* **3**, 128-33 (2001).
14. Holcik, M., Gibson, H. & Korneluk, R.G. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* **6**, 253-61 (2001).
15. Deveraux, Q.L. & Reed, J.C. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **13**, 239-52 (1999).
16. Fong, W.G. et al. Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. *Genomics* **70**, 113-22 (2000).
17. Tamm, I. et al. Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clin Cancer Res* **6**, 1796-803 (2000).
18. Plenchette, S., Cheung, H.H., Fong, W.G., LaCasse, E.C. & Korneluk, R.G. The role of XAF1 in cancer. *Curr Opin Investig Drugs* **8**, 469-76 (2007).
19. Kempkensteffen, C. et al. Down-regulation of the pro-apoptotic XIAP associated factor-1 (XAF1) during progression of clear-cell renal cancer. *BMC Cancer* **9**, 276 (2009).
20. Ng, K.C., Campos, E.I., Martinka, M. & Li, G. XAF1 expression is significantly reduced in human melanoma. *J Invest Dermatol* **123**, 1127-34 (2004).
21. Xia, Y., Novak, R., Lewis, J., Duckett, C.S. & Phillips, A.C. Xaf1 can cooperate with TNFalpha in the induction of apoptosis, independently of interaction with XIAP. *Mol Cell Biochem* **286**, 67-76 (2006).
22. Tu, S.P. et al. Tumor suppressor XIAP-Associated factor 1 (XAF1) cooperates with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand to suppress colon cancer growth and trigger tumor regression. *Cancer* (2010).
23. Yin, W., Cheepala, S. & Clifford, J.L. Identification of a novel splice variant of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* **339**, 1148-54 (2006).
24. Ma, T.L. et al. Low expression of XIAP-associated factor 1 in human colorectal cancers. *Chin J Dig Dis* **6**, 10-4 (2005).
25. Byun, D.S. et al. Hypermethylation of XIAP-associated factor 1, a putative tumor suppressor gene from the 17p13.2 locus, in human gastric adenocarcinomas. *Cancer Res* **63**, 7068-75 (2003).
26. Lee, M.G. et al. Promoter CpG hypermethylation and downregulation of XAF1 expression in human urogenital malignancies: implication for attenuated p53 response to apoptotic stresses. *Oncogene* **25**, 5807-22 (2006).
27. Zou, B. et al. Correlation between the single-site CpG methylation and expression silencing of the XAF1 gene in human gastric and colon cancers. *Gastroenterology* **131**, 1835-43 (2006).
28. Huang, J. et al. XAF1 as a prognostic biomarker and therapeutic target in pancreatic cancer. *Cancer Sci* (2009).
29. Yang, L., Cao, Z., Yan, H. & Wood, W.C. Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy. *Cancer Res* **63**, 6815-24 (2003).
30. Leaman, D.W. et al. Identification of X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor-1 as an interferon-stimulated gene that augments TRAIL Apo2L-induced apoptosis. *J Biol Chem* **277**, 28504-11 (2002).
31. Guan, X.Y. et al. Evidence for another tumor suppressor gene at 17p13.3 distal to TP53 in hepatocellular carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* **140**, 45-8 (2003).

32. Davidson, E.H., Jacobs, H.T. & Britten, R.J. Very short repeats and coordinate induction of genes. *Nature* **301**, 468-70 (1983).
33. Krebs, J., Goldstein, E., Kilpatrick, S. . Lewin's Essential Genes (Jones and Barlett, Sudbury, Massachusetts, 2009).
34. Latchman, D.S. Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol* **29**, 1305-12 (1997).
35. Chung, S.K. et al. Frequent alteration of XAF1 in human colorectal cancers: implication for tumor cell resistance to apoptotic stresses. *Gastroenterology* **132**, 2459-77 (2007).
36. Micali, O.C. et al. Silencing of the XAF1 gene by promoter hypermethylation in cancer cells and reactivation to TRAIL-sensitization by IFN-beta. *BMC Cancer* **7**, 52 (2007).
37. Lind, G.E. et al. A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. *Mol Cancer* **3**, 28 (2004).
38. Wang, J. et al. HSF1 down-regulates XAF1 through transcriptional regulation. *J Biol Chem* **281**, 2451-9 (2006).
39. Zhang, W. et al. Identification of a functional p53 responsive element within the promoter of XAF1 gene in gastrointestinal cancer cells. *Int J Oncol* **36**, 1031-7 (2010).
40. Gaur, U. & Aggarwal, B.B. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol* **66**, 1403-8 (2003).
41. Straszewski-Chavez, S.L. et al. XAF1 mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and X-linked inhibitor of apoptosis cleavage by acting through the mitochondrial pathway. *J Biol Chem* **282**, 13059-72 (2007).
42. Hayden, M.S. & Ghosh, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**, 344-62 (2008).
43. Sen, R. & Baltimore, D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**, 921-8 (1986).
44. Hoffmann, A., Natoli, G. & Ghosh, G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene* **25**, 6706-16 (2006).
45. Rothwarf, D.M., Zandi, E., Natoli, G. & Karin, M. IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the I kappa B kinase complex. *Nature* **395**, 297-300 (1998).
46. Karin, M. & Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* **18**, 621-63 (2000).
47. Gilmore, T.D. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680-4 (2006).
48. Britanova, L.V., Makeev, V.J. & Kuprash, D.V. In vitro selection of optimal RelB/p52 DNA-binding motifs. *Biochem Biophys Res Commun* **365**, 583-8 (2008).
49. Perkins, N.D. Post-translational modifications regulating the activity and function of the nuclear factor kappa B pathway. *Oncogene* **25**, 6717-30 (2006).
50. Korbie, D.J. & Mattick, J.S. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc* **3**, 1452-6 (2008).
51. Bouwmeester, T. et al. A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol* **6**, 97-105 (2004).
52. Sheehan, M. et al. Parthenolide, an inhibitor of the nuclear factor-kappaB pathway, ameliorates cardiovascular derangement and outcome in endotoxic shock in rodents. *Mol Pharmacol* **61**, 953-63 (2002).
53. Vogelstein, B. et al. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* **244**, 207-11 (1989).
54. Chen, F.E. & Ghosh, G. Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene* **18**, 6845-52 (1999).
55. Secchiero, P. et al. Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TNF-alpha promote the NF-kappaB-dependent maturation of normal and leukemic myeloid cells. *J Leukoc Biol* **74**, 223-32 (2003).
56. Hsu, H., Xiong, J. & Goeddel, D.V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* **81**, 495-504 (1995).