



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina.

Identificación de Reguladores
Transcripcionales de Smac/DIABLO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Biología Experimental)

P R E S E N T A

ROMAN ALEJANDRO GARCÍA RAMÍREZ.

TUTORA: Gisela Ceballos Cancino.
Doctora en Ciencias Biomédicas

COMITÉ TUTOR: Dra. Vilma Maldonado Lagunas.
Dr. Emilio Joaquín Córdova Alarcón.
Dra. Laura del Bosque Plata.
Dra. Elena Zambrano González.

MÉXICO, D.F.

Marzo de 2011.



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 17 de enero de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **GARCÍA RAMÍREZ ROMAN ALEJANDRO** con número de cuenta **301583284** con la tesis titulada **"IDENTIFICACIÓN DE REGULADORES TRANSCRIPCIONALES DE Smac/DIABLO."**, realizada bajo la dirección del : **DRA. GISELA CEBALLOS CANCINO**

Presidente: DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS
Vocal: DR. EMILIO JOAQUÍN CÓRDOVA ALARCÓN
Secretario: DRA. GISELA CEBALLOS CANCINO
Suplente: DRA. LAURA DEL BOSQUE PLATA
Suplente: DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 11 de marzo de 2011

M. del Coro Arizmendi
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por las facilidades brindadas para la realización de esta tesis.

Gracias al CONACyT por el apoyo económico brindado, así como el seguimiento del proyecto durante su realización.

Gracias a los miembros del comité tutorial: Dr. Emilio Joaquín Córdova Alarcón y a la Dra. María de Lourdes Segura por el valioso tiempo brindado, los atinados consejos y la disposición ante todo para la revisión, corrección y conclusión de este trabajo. De igual forma quiero agradecer a las Doctoras Vilma Maldonado Lagunas, Laura del Bosque Plata y Elena Zambrano por su colaboración y apoyo en la revisión final de la tesis.

A mis padres, Virginia y Salvador; así como mi hermana, por su amor, sus cuidados, sus atenciones, consejos y tiempo entregado. Gracias por ser los mejores padres, que Dios me pudo regalar.

A mis abuelos y tías por su preocupación por mí y su amor desmedido, su ternura y amor. Abuelo eres, un gran ejemplo de vigor, entrega, compromiso y dedicación. Aún me falta aprender más de ti. Gracias por infundirme la importancia de desarrollar un carácter diligente.

A Paola, que siempre está presente en cada una de las etapas de mi vida desde hace 8 años. Sin ti, no lo hubiera logrado. Gracias por alentarme siempre y ser ese gran apoyo y la luz en mi andar.

Asimismo, quiero agradecer al Dr. Jorge Meléndez no sólo por las facilidades y el apoyo brindado para la realización de este proyecto, sino también por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme así continuar en mi camino de aprendizaje y formación científica.

Un especial agradecimiento a la Dra. Gisela Ceballos Cancino, por su asesoría y dirección en el trabajo, así como sus consejos y apoyo brindado a nivel profesional y académico. Gracias porque bajo tu dirección aprendí la importancia de realizar todo de la mejor manera posible. Admiro la calidad humana y profesional con la que siempre me guiaste.

A mis camaradas de siempre Alexander, Ale y Celes porque a pesar de la distancia siempre permanecemos juntos, buscando el beneficio y progreso de los tres.

Finalmente, gracias a los miembros del laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer, por haber hecho de este lugar un gran espacio de trabajo y aprendizaje. Gracias a la Dra. Denise Campos por sacarme de tantos apuros y por su solidaridad en todo momento, al Dr. Julio Pérez Carreón por su amistad e importantes consejos brindados, a Javier Gaytán por no tirarme del nido y estar ahí siempre como un buen amigo, a Nelly Patiño por su amistad y camaradería, a Adriana Balderas, Angela Schwarz, Iván Bahena, Lorena Pinedo, Gustavo Martínez, AleC., Karla Méndez, Sergio, Franz, Dr. Del Pozo, Luzma y Sergio por crear la atmósfera propicia para trabajar y desarrollarme.

DEDICATORIA.

**A Dios, por ser el motor de mi vida. Es Él quien me regalo esta tesis y todo lo que acontece
día a día en mi vida.**

A mis padres,

Por darme la vida y dejarme tomar las decisiones en ésta

A mi hermana,

Por estar a mi lado desde hace 18 años y ser el brillo en mi vida

A mis abuelos y tíos,

Por nunca cansarse de apoyarme y aconsejarme

A Paola,

Por alentarme cada día de mi vida y support-arme.

Fil. 4:13 Todo lo puedo en Cristo que me fortalece.

Is. 55:8-9 “Porque mis pensamientos no son vuestros pensamientos, ni vuestros caminos mis caminos, dijo Jehová.

*Como son más altos los cielos que la tierra, así son mis caminos más altos que vuestros caminos, y mis pensamientos
más que vuestros pensamientos”.*

INDICE.

I. RESUMEN.....	7
II. ABSTRACT.....	8
III. INTRODUCCIÓN.....	9
IV. MARCO TEÓRICO.....	11
1. Cáncer.....	11
1.1 Características principales de las células tumorales.....	11
2. Apoptosis.....	12
2.1 Caspasas.....	13
2.2 Vías de señalización de la apoptosis.....	13
3. Inhibidores de la apoptosis (IAPs).....	15
3.1 Descripción de las IAPs.....	15
3.2 Características de las IAPs.....	15
4. Smac/DIABLO.....	16
4.1 Características de Smac/DIABLO.....	16
4.2 Interacción de Smac/ DIABLO con las IAPs.....	17
4.2.1 Mecanismo de liberación de Smac/DIABLO desde la mitocondria.....	17
4.3 Desregulación de Smac/DIABLO en el cáncer.....	18
4.4 Regulación transcripcional de Smac /DIABLO.....	20
4.4.1 Par-4.....	20
4.4.2 E2F1.....	20
4.4.3 Interferon γ (IFN γ).....	21
4.4.4 TNF y ácido fólico.....	22
4.4.5 NF- κ B.....	22
5.1 Características y vías de señalización del factor NF- κ B.....	22
V. ANTECEDENTES PRELIMINARES.....	25
VI. HIPÓTESIS.....	26
VII. OBJETIVOS.....	27
1. Objetivo General.....	27
2. Objetivos específicos.....	27
VIII. MÉTODOS.....	28
1. Líneas celulares.....	28
1.1 Cultivo celular en monocapa.....	28
1.2 Vectores utilizados.....	28
2. Miniprep.....	31

3. Digestión con enzimas de restricción	31
4. Búsqueda de factores transcripcionales putativos	31
5. Mutagénesis	31
6. SNAP MiniPrep Kit (<i>Invitrogen</i>).....	32
7. Secuenciación.....	32
8. MidiPrep.....	33
9. Cotransfección	33
10. Ensayo de gen reportero	33
11. Cuantificación de β -gal.	34
12. Cuantificación de proteína.....	34
13. Prueba estadística.....	35
14. Extracción de RNA total.....	35
15. RT-PCR.....	35
15.1 Oligos y condiciones.....	35
16. Extracción de DNA genómico.....	36
17. PCR anidado.....	37
18. Purificación de DNA a partir de gel de agarosa.....	38
19. Clonación del fragmento de 1.5KB del promotor de Smac/DIABLO en el vector pTZ57-RT.....	38
20. Clonación del fragmento de 1.5KB del promotor de Smac/DIABLO en el vector pSEAP-Basic.....	39
21. Cuantificación de luciferasa.....	39
IX. RESULTADOS.....	40
1. Caracterizar la región promotora de Smac/DIABLO en donde al parecer reside el silenciador transcripcional.....	40
1.2 Secuenciación de las construcciones.....	42
2. Búsqueda de los factores de transcripción que interactúan en la región diferencial del promotor de Smac/DIABLO.....	43
3. Identificación del silenciador transcripcional que actúa en la región promotora de Smac/DIABLO...	45
3.1 Análisis de la regulación transcripcional del promotor de Smac/DIABLO por NF- κ B.....	48
3.1.1 Determinación de los niveles de expresión de Smac/DIABLO en líneas celulares con la vía NF- κ B alterada.....	48
3.1.2 Ensayos <i>in silico</i> del factor NF- κ B.....	49
3.2 Amplificación de la región promotora de Smac / DIABLO.....	51
3.3 Clonación del promotor de 1.5 Kb de Smac/ DIABLO en el vector pTZ57R/T.....	54
3.4. Clonación del promotor de 1.5 Kb de Smac / DIABLO en el vector pSEAP-Basic.....	54
X. DISCUSIÓN.....	57
XI. PERSPECTIVAS.....	63
XII. CONCLUSIONES.....	64

XIII. ANEXOS.....	65
1. Factor transcripcional AP2 α	65
2. Factor Transcripcional AML1.....	66
3. Abreviaturas.....	67
4. Abreviaturas de unidades de medición.....	69
XIV. BIBLIOGRAFÍA.....	70

I. RESUMEN.

El cáncer permanece a la fecha como una de las causas principales de muerte a nivel mundial. Diferentes procesos biológicos participan en el desarrollo y progresión del cáncer, entre los más importantes se encuentran la pérdida de la regulación de la proliferación celular y la supresión de la apoptosis. La apoptosis es un tipo de muerte celular ampliamente conservada en los organismos metazoos en el que participan una diversidad de proteínas; sin embargo, las caspasas son los componentes esenciales de la respuesta apoptótica. La actividad de las caspasas es regulada de forma negativa por las Proteínas Inhibidoras de Apoptosis (IAPs). Durante el proceso apoptótico la actividad anti-apoptótica de las IAPs debe ser eliminada, esta función la realiza la proteína mitocondrial Smac/DIABLO. La expresión de Smac/DIABLO se ha visto alterada en diversos tipos de tumores, mientras que en unos se incrementa en otros disminuye. No obstante, poco se ha estudiado acerca de los mecanismos que conllevan a esta desregulación; en particular, a nivel transcripcional.

Para profundizar en el estudio de la regulación transcripcional de Smac/DIABLO, se analizó una región del promotor de este gen que previamente había sido investigada en nuestro grupo de trabajo (Martínez, 2007). A partir de análisis bioinformáticos se propusieron dos posibles reguladores transcripcionales para esta región, AP2 α y AML1. Los sitios de unión de dichos factores se mutaron y el efecto sobre la transcripción de un gen reportero fue analizada. Adicionalmente, se investigó la participación del factor NF- κ B en la regulación de la expresión de Smac/DIABLO. Se utilizaron líneas celulares estables en donde se encontraba alterada la vía de NF- κ B y el efecto sobre los niveles de ARNm de Smac/DIABLO se analizó por RT-PCR. De igual forma con la ayuda de herramientas bioinformáticas se propuso una región del promotor en donde podría estar actuando NF- κ B.

Los ensayos de gen reportero mostraron que los factores AP2 α y AML1 no presentaron un papel significativo en la regulación de la expresión del mensajero de Smac/DIABLO ($p=0.75$ y $p=0.70$, respectivamente). Mientras que, los resultados obtenidos con NF- κ B sugieren que este factor podría ser un regulador positivo de Smac/DIABLO. La clonación de la región promotora de Smac/DIABLO que contiene el sitio de unión para NF- κ B permitirá realizar más estudios para demostrar la participación de dicho factor en la regulación de la expresión.

II. ABSTRACT.

Cancer remains until date as one of the leading causes of death globally. Different biological processes involved in the development and progression of cancer, the most important are the deregulation of cell proliferation and suppression of apoptosis. Apoptosis is a type of cell death widely conserved in metazoan organisms involving a variety of proteins, however, caspases are essential components of the apoptotic response, its activity is regulated in a negative manner by Apoptotic Inhibitor Proteins (IAPs). During apoptotic process, anti-apoptotic IAPs activity should be removed, this function is performed by the mitochondrial protein Smac / DIABLO. Smac / DIABLO expression have seen deregulated in diverse cancer types, meanwhile in some of them the levels increases in other decreases, nevertheless little has been studied about the mechanisms that lead to such deregulation, in particular, the transcriptional level. To further study the transcriptional regulation of Smac/DIABLO, we analyzed a promoter region of this gene had previously been investigated in our work group (Martínez, 2007). From bioinformatics analysis we proposed two potential transcriptional regulators for this region, AP2 α and AML1. The binding sites of these factors were mutated and the effect on transcription of a reporter gene was analyzed. Additionally, we investigated the involvement of NF- κ B in regulating the expression of Smac / DIABLO. Stable cell lines were used where the NF- κ B signalling was altered and the effect on mRNA levels of Smac / DIABLO was analyzed by RT-PCR. Likewise with the help of bioinformatics tools suggested a promoter region where it could be acting NF- κ B.

The reporter gen assays showed that factors AP2 α and AML1 did not have a significant role in Smac/DIABLO promoter regulation ($p=0.75$ y $p=0.70$, respectively), Mean while NF- κ B leaves the way open as a strong candidate regulator Smac/ DIABLO. Cloning of the promoter region of Smac / DIABLO that contains the binding site for NF- κ B allow more studies to demonstrate the participation of this factor in regulating expression.

III. INTRODUCCIÓN.

El cáncer permanece a la fecha como una de las causas principales de muerte a nivel mundial. Podemos decir que son dos los principales pre-requisitos necesarios para que ocurra el proceso canceroso: la desregulación de la proliferación celular y la supresión de apoptosis. Estas dos condiciones permiten a la célula transformarse a un fenotipo maligno y expandirse. La apoptosis es una forma de muerte celular altamente conservada esencial para el correcto desarrollo y homeostasis de tejidos de los organismos metazoos. Un desequilibrio en la regulación de este proceso da lugar a diversas patologías en humanos, como el cáncer, enfermedades autoinmunes y desórdenes neurodegenerativos. A nivel molecular la muerte celular programada puede ser dividida en tres: iniciación, ejecución y término de la apoptosis. La apoptosis puede ser inducida por una diversidad de estímulos, que incluye la evasión de las señales de crecimiento, luz UV o irradiación, fármacos citotóxicos y ligandos de receptores de muerte. Existen dos rutas de señalización de la apoptosis en mamíferos altamente caracterizadas: la vía intrínseca y la vía extrínseca. En la vía intrínseca participan proteínas que son liberadas de la mitocondria en respuesta a diferentes estímulos, como el estrés celular, daño al DNA, radiaciones ultravioleta y agentes antineoplásicos. La activación de la vía extrínseca se da por la unión de ligandos de receptores de muerte a los receptores de muerte específicos localizados en la superficie celular. Ambas rutas convergen en la activación una familia de proteasas conocidas como caspasas.

La actividad de las caspasas es regulada de forma negativa por las Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis (IAPs), las cuáles se caracterizan por poseer de uno a tres dominios BIR (Repeticiones IAP baculovirales), responsables de su actividad anti-apoptótica. Durante el proceso apoptótico la inhibición de caspasas mediada por IAPs deber ser eliminada, esta función la realiza la proteína mitocondrial Smac/DIABLO (segundo activador de caspasas derivado de mitocondria/ proteína de unión directa a IAPs de bajo punto isoeléctrico). Smac/DIABLO es sintetizada como una proteína precursora de 239 aminoácidos (a.a.) y contiene en el extremo N-terminal una secuencia de localización mitocondrial de 55 aa., la cual es cortada durante la importación a la mitocondria (1). Posterior a un estímulo apoptótico, Smac/DIABLO es liberada al citosol donde neutraliza a las IAPs, potenciando así la apoptosis. Debido a que la proteína madura, capaz de interactuar con las IAPs, se encuentra en la mitocondria, se ha considerado que su liberación mitocondrial es su principal mecanismo de regulación.

Poco se ha estudiado acerca de la regulación transcripcional de Smac/DIABLO. Se sabe que el ácido fólico, el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y el Interferón γ (IFN- γ) incrementan el ARNm de Smac/DIABLO, este incremento estuvo asociado a la apoptosis inducida por estas moléculas. También se sabe que el cAMP, E2F1 y Par-4 regulan positivamente la expresión de este gen.

En el cáncer se ha observado una expresión desregulada de Smac/DIABLO. En el carcinoma hepatocelular y cáncer de pulmón se observó una disminución en los niveles del ARNm de Smac/DIABLO en comparación con tejidos sanos, donde los pacientes que presentaban los niveles más bajos de expresión tuvieron un peor pronóstico. De forma contraria, los niveles de expresión del ARNm de Smac/DIABLO fueron significativamente mayores en muestras de carcinomas gástricos y de cáncer cervicouterino. A pesar de estas diferencias la regulación de la expresión de este gen ha sido poco estudiada. Por estos motivos, la identificación y caracterización de los factores transcripcionales que regulan la expresión de Smac/DIABLO permitirá abundar en las vías que conducen a su desregulación en el cáncer.

En nuestro grupo de trabajo se analizó y caracterizó el promotor mínimo de Smac/DIABLO, en este estudio previo se observó una región del promotor donde al parecer actúa un silenciador transcripcional, ya que en ensayos de gen reportero la delección de esta región indujo un incremento importante en la expresión del reportero. Para identificar el posible silenciador transcripcional se amplificaron y secuenciaron dos construcciones del promotor de Smac/DIABLO en donde se observó la región reguladora. Posteriormente se utilizaron herramientas bioinformáticas para realizar la búsqueda de factores de transcripción que presentaran sitios de unión en esta región del promotor. De los factores transcripcionales obtenidos de la búsqueda, se seleccionaron aquéllos con mayor probabilidad de unirse al promotor (AP2 α y AML1). Posteriormente, se realizaron mutaciones dirigidas en los sitios de unión identificados utilizando kit QuickLightning (*Stratagen*). El efecto de las mutaciones sobre la actividad del promotor se evaluó por medio de ensayos de gen reportero. Para ello, se transfectaron células HeLa utilizando liposomas y se evaluó la actividad del reportero. Este último ensayo demostró que los factores AP2 α y AML 1 no desempeñan un papel significativo en la regulación transcripcional de Smac/ DIABLO

Adicionalmente se estudio la participación de NF- κ B en la regulación de la expresión del ARNm de Smac/DIABLO. Para estudiar el papel de NF- κ B se clonó una región de 1.5 kb del promotor de Smac/DIABLO en donde por medio de herramientas bioinformáticas se identificó un sitio de unión para dicho factor. La secuencia promotora fue clonada río arriba de un gen reportero lo cual permitirá realizar estudios para determinar la participación de NF- κ B en la regulación del mensajero de Smac/DIABLO.

IV. MARCO TEÓRICO.

1. Cáncer.

El cáncer es responsable de una de cada ocho muertes en el mundo. De igual forma abarca variadas enfermedades con diferentes factores de riesgo y epidemiología, las cuales se originan en la mayoría de tipos celulares y órganos del cuerpo humano y son caracterizados por una proliferación descontrolada de células que pueden invadir y formar nuevos tumores en tejidos distantes (1).

El cáncer surge de un proceso multifactorial que involucra la oncogenes y genes supresores de tumores que convergen en la regulación de la apoptosis. Las alteraciones genéticas y epigenéticas, dan paso a cambios en los ciclos de proliferación celular, programas de diferenciación y vías de muerte celular (2). Los cambios genéticos iniciales resultan en una hiperploriferación de células normales y la adquisición de nuevas mutaciones y cambios epigenéticos que llevan al desarrollo de displasias de adenocarcinomas y otras lesiones. La acumulación de otras mutaciones puede influir en el desarrollo de angiogénesis, migración y metástasis (3).

1.1 Características principales de las células tumorales.

Weinberg y colaboradores han propuesto que la amplia gama de genotipos de cánceres celulares es consecuencia de la alteración de seis procesos esenciales en la fisiología celular que en conjunto dictaminan el crecimiento maligno: autosuficiencia de señales de crecimiento, pérdida de sensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, evasión de la muerte celular programada, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión tisular y metástasis (2) (Fig. 1). Adicionalmente, numerosas evidencias proponen la existencia de un séptimo proceso: la inflamación (4).

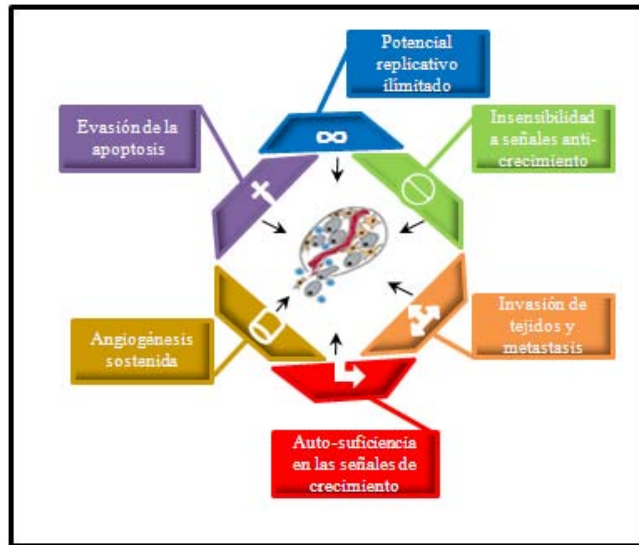


Fig.1 Características principales de las células tumorales. Cada uno de estos cambios fisiológicos; adquiridos durante el desarrollo tumoral, representan mecanismos exitosos en la evasión de la respuesta anticancerígena (Tomado y modificado de Hanahan D. y col., 2000).

De las características mencionadas en el párrafo anterior, son 2 los principales pre-requisitos necesarios para que ocurra el proceso canceroso: la desregulación de la proliferación celular y la supresión de apoptosis. Estas dos condiciones permiten a la célula transformarse a un fenotipo maligno y expandirse (5, 6, 7). Las estrategias para favorecer la muerte celular por apoptosis son más efectivas que aquellas que intentan interrumpir la progresión de la proliferación celular; además, las células cancerosas frecuentemente pierden los puntos de control del ciclo celular y las funciones de reparación, o ambas. La sobrevivencia de las células cancerosas a la quimioterapia o radioterapia dependerá de los puntos de control específicos y/o mecanismos de reparación que han sido alterados, permitiendo ya sea susceptibilidad a estos agentes cuando la reparación del daño es más importante para sobrevivir, o bien, resistencia cuando la respuesta apoptótica es prioritaria (8). Además, la muerte celular por apoptosis ocurre como un balance del control positivo y negativo de las señales de proliferación (9,10).

2. Apoptosis.

La apoptosis, es un proceso central en el desarrollo y la homeostasis de los organismos metazoos (11, 12, 13, 14, 15). La desregulación de este proceso conlleva a una variedad de patologías humanas que incluyen al cáncer, enfermedades autoinmunes y desórdenes neurodegenerativos. Desde que se estableció el concepto de apoptosis en 1972 (16), los esfuerzos en la investigación han llevado a la búsqueda de cientos de genes que controlan la iniciación, ejecución y regulación de la apoptosis en diferentes especies (13).

2.1 Caspasas.

Las caspasas son los componentes esenciales en la respuesta apoptótica (17, 18). Las caspasas (las cuales son llamadas así por ser proteasas de cisteína que cortan después de un residuo de aspartato en sus sustratos) (19), son una familia conservada de enzimas que llevan irreversiblemente a la muerte de la célula. Se han identificado al menos 14 distintas caspasas en mamíferos, de las cuales 11 se presentan en humanos (17). Se han reportado homólogos de las caspasas en diferentes especies, desde nemátodos hasta dípteros (*Drosophilla melanogaster*) (20) e incluso en levaduras como *Saccharoyces cerevisiae* (21). Las caspasas están generalmente divididas en dos clases: las caspasas iniciadoras, las cuales incluyen a las caspasas-2,-8,-9 y -10 en mamíferos y Drone y Dredd en moscas de la fruta; y las caspasas efectoras las que incluyen a las caspasas -3, -6 y -7 en mamíferos y Drice, Decay, Damm, Dcp1 y Strica en *drosophila* (17).

Todas las caspasas son producidas en las células como zimógenos y deben ser activadas proteolíticamente durante la apoptosis (17). La activación de una caspasa efectora, como la caspasa-3 y Drice, es llevada a cabo por una caspasa iniciadora, como la caspasa-9 y Drone, respectivamente. Lo anterior está dado por un corte específico interno en el residuo de Asp que separa a las subunidades pequeñas (p10) y grandes (p20). Las subunidades p10 y p20 están estrechamente relacionadas una con otra para formar un monómero de caspasas (22). De forma contraria, las caspasas iniciadoras son auto-activadas por oligomerización. Y dado que la activación de caspasas iniciadoras en las células inevitablemente disparan una cascada río abajo de activación de caspasas, este proceso está fuertemente regulado y por lo general requiere el ensamblado de complejos multi- componentes bajo condiciones apoptóticas.

2.2 Vías de señalización de la apoptosis.

En las células de mamífero, la respuesta apoptótica es mediada a través de la ruta extrínseca e intrínseca, representadas en la Fig.2, dependiendo del origen del estímulo de muerte (23).

La vía extrínseca es iniciada por la unión de un factor muerte extracelular como lo es FasL, a su receptor de muerte de superficie, en este caso Fas (24). Los ligando de muerte son homotrímeros constitutivos; así que la unión a sus receptores lleva a la formación de un complejo ligando-receptor homotrimerico que recluta a otros factores citosólicos, como lo son FADD y la caspasa-8 lo que forma un complejo de señalización inductor de muerte oligomérico (DISC) (25). La formación del complejo DISC lleva a la activación de la caspasa iniciadora, caspasa-8, la cual corta y activa la caspasa efectora, caspasa-3. Se piensa que la función de DISC en la activación de la caspasa-8 es análoga a la del apoptosoma en la activación de la caspasa-9, sin embargo, los mecanismos moleculares a detalle permanecen desconocidos. La ruta extrínseca puede converger

con las vía intrínseca a través del corte de BID mediado por la caspasa-8, lo cual activa entonces la liberación de proteínas mitocondriales (26, 27).

La vía intrínseca es iniciada en respuesta a un amplio espectro de estímulos de muerte, como lo es la activación de oncogenes, el daño al ADN por radiación, agentes químicos y estrés oxidativo (28). La ruta intrínseca es mediada por la mitocondria y, en respuesta a estímulos apoptóticos, diversas proteínas son liberadas desde el espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citoplasma (14). Algunas de las proteínas que han sido bien caracterizadas son, el citocromo c, Smac/DIABLO (del inglés *Second Mitochondria-derived Activator of Caspases*)/(Direct Inhibitor of Apoptosis (IAP)- binding protein with low pI), AIF (Apoptosis Inducing Factor), EndoG (endonuclease G) y OMI/ HTRA2 (high temperature –requierment protein A2). Sin embargo, de todas las proteínas pro-apoptóticas anteriores, la más interesante es el citocromo c, la cual se une y activa a la proteína APAF-1 para unirse al ATP/dATP para formar el apoptosoma, este último media la actividad de la caspasa 9 permitiendo así la activación de las caspasas (29, 30, 31, 32, 33).

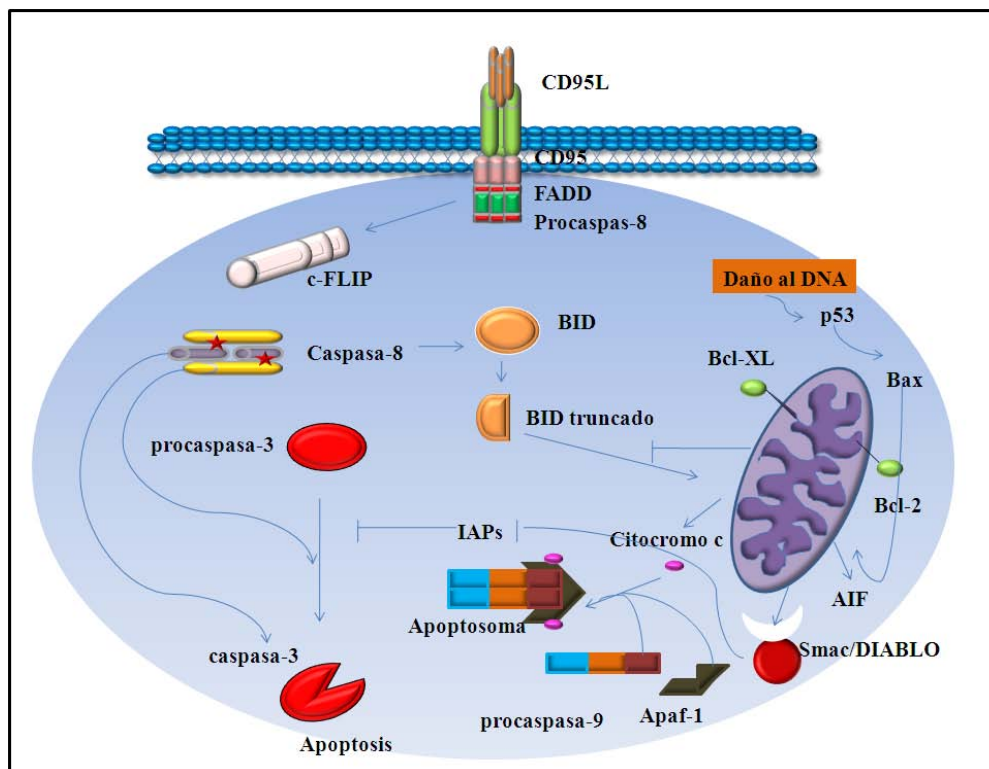


Fig.2 Las dos principales vías apoptóticas. Las vías extrínseca e intrínseca (mitocondrial) son activadas en respuesta a estímulos apoptóticos externos e internos respectivamente. La mitocondria contiene diversas proteínas proapoptóticas que tienen un papel clave en la apoptosis. La vía intrínseca se lleva a cabo por la liberación del citocromo c el cual se une directamente a Apaf-1 y lo activa, lo cual facilita la activación de la caspasa 9 que a su vez activa la caspasa 3. Por otro lado, la vía extrínseca lleva a la activación de la caspasa 8 la cual activa a la caspasa 3; de esta forma, ambas vías convergen en la activación de la caspasa 3. La ruta extrínseca converge con la ruta intrínseca a través del corte de Bid mediado por la caspasa 8. Bid truncado (tBid) induce de esta forma la liberación de las proteínas mitocondriales. Otras de las proteínas presentes en el proceso apoptótico, son las IAPs (Proteínas Inhibidoras de la Apoptosis), las cuales como su nombre lo indica inhiben la apoptosis inhibiendo la actividad de las caspasas. Por su parte, Smac/DIABLO remueve la inhibición de las caspasas mediada por las IAPs, reactivando el proceso apoptótico. Otras proteínas como son el factor inductor de apoptosis AIF, EndoG y Omi (también conocido como HtrA2), también son liberadas desde la mitocondria

hasta el citoplasma para facilitar la muerte celular de la apoptosis. Las flechas azules indican el flujo de señalización, mientras que las líneas perpendiculares indican inhibición. (Tomado y modificado de *Hengartner, 2000*).

3. Inhibidores de la apoptosis (IAPs).

3.1 Descripción de las IAPs.

Las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) pueden potencialmente inhibir la actividad de caspasas, así como promover su degradación a través de la ubiquitinación de la vía mediada por proteosoma (17, 34, 35, 36).

Las proteínas IAPs, fueron originalmente identificadas en el genoma de Baculovirus a partir de su habilidad para suprimir la apoptosis en células hospederas infectadas (37), se encuentran en mamíferos y moscas de la fruta (35, 38). Existen 8 IAPs en mamíferos las cuales incluyen XIAP, c-IAP1, cIAP2, ML-IAP/livina, ILP2, NAIP, BRUCE/Apollon y Survivina; y dos IAPs en *Drosophila*, las cuales incluyen Diap1 y Diap2, los miembros de esta familia se muestran en la Fig. 3. En mamíferos las caspasas efectoras 3 y 7 son inhibidas por c-IAP1, c-IAP2 y NAIP (35), mientras que la caspasa iniciadora -9 es inhibida por XIAP (17).

3.2 Características de las IAPs.

La característica principal de las IAPs es la presencia de los repetidos tipo IAP baculoviral (BIR), los cuales son dominios de unión a zinc de ~80 aminoácidos (39, 40). XIAP, c-IAP1 y cIAP2 contienen cada uno tres dominios BIR y cada uno de ellos tiene diferentes funciones (19). En XIAP, el tercer dominio BIR (BIR3) inhibe potencialmente la actividad de la caspasa 9, mientras que la región de unión de BIR 1 y BIR2 específicamente inhibe a la caspasa 3 y 7. La survivina contiene un único dominio BIR, el cual al menos *in vitro* no inhibe la actividad de las caspas (39, 40).

Con excepción de la survivina todas las otras IAPs de mamífero contienen otros dominios funcionales como el dominio RING (del inglés Really Interesting New Gene) y/o CARD. Durante la apoptosis la inhibición de las caspasas mediada por las IAPs es antagonizada por la familia de proteínas que contienen un motivo de tetrapéptido de unión a IAPs, como por ejemplo Smac/DIABLO (41, 42, 43). Otra proteína mitocondrial, HTRA2/OMI, también contiene un motivo de unión a IAP en su región N-terminal y puede antagonizar la inhibición de la caspasa 9 mediada por XIAP a altas concentraciones. En moscas de la fruta existen al menos 4 miembros funcionales homólogos a Smac/DIABLO: Reaper, Hide, Grim y Sickie, que son colectivamente denominadas como proteínas RHG (42, 44, 45).

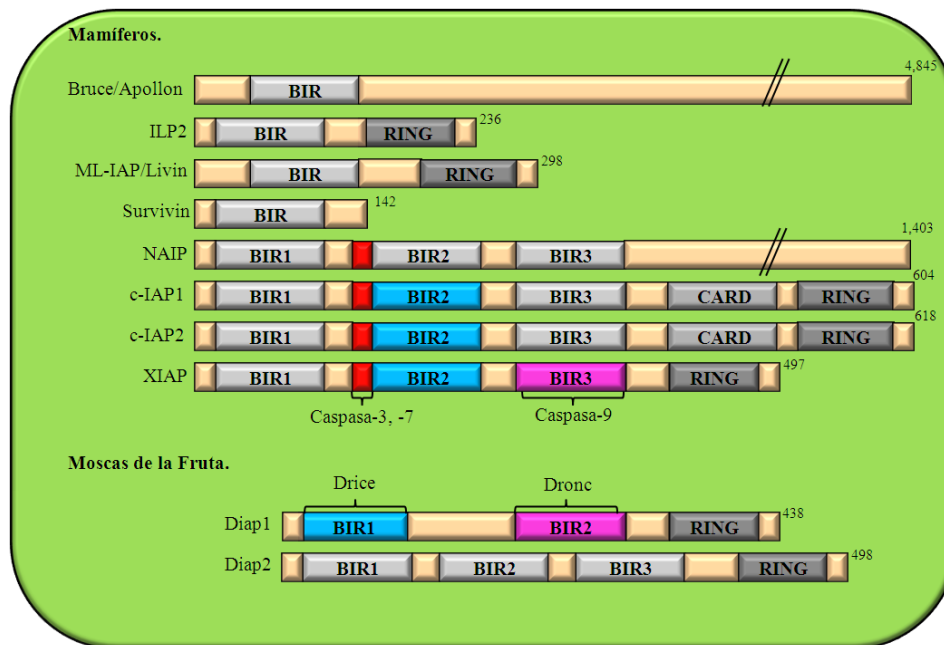


Fig. 3 Familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs). Los dominios BIR que han sido caracterizados bioquímicamente y se sabe tienen funciones relevantes son resaltados en color. La familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP) incluye a los miembros XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP2, ML IAP/ Livina, NAIP y Survivina. Un péptido de unión conservado que precede al dominio BIR2 de XIAP, cIAP1 o cIAP2, el cual se muestra en rojo, es responsable de inhibir a la caspa 3 y 7 en mamíferos. Solamente el dominio BIR3 de XIAP puede potencializar la inhibición de la caspasa 9. En moscas de la fruta, los dominios BIR1 y BIR2 de Diap1 y no de Diap2, son responsables de inhibir a los homólogos de la caspasa 3 y 9, es decir Drice y Dronc respectivamente (Tomada y modificada de Riedl SJ y col.).

4. Smac/DIABLO.

4.1 Características de Smac /DIABLO.

En mamíferos, el miembro fundador de la familia de los inhibidores de las IAPs es la proteína mitocondrial Smac (del inglés, Second Mitochondria derived Activator of Caspase) y su ortólogo murino DIABLO (Direct Inhibitor of apoptosis (IAP)- Binding protein with low pI). Ésta promueve la activación de caspasas a través de la eliminación de los inhibidores de caspasas, las IAPs. Smac/DIABLO es sintetizada como una proteína precursora de 239 aminoácidos y cuenta con una región N- terminal de 55 aminoácidos que funciona como secuencia de localización mitocondrial. Adicionalmente contiene un tetrapéptido en su región N-terminal –Ala-Val-Pro-Ile- (AVPI); el cual se genera como consecuencia del corte de la secuencia de localización mitocondrial, uniéndose a la superficie del dominio BIR3 de XIAP, (17, 41).

Durante la apoptosis Smac/DIABLO es liberado desde el espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citosol en respuesta a diversos estímulos apoptóticos, donde interactúa con diversas IAPs y remueve la inhibición mediada por éstas, tanto en el caso de las caspasas iniciadoras como efectoras; restaurando la apoptosis (42, 43). Smac/DIABLO es altamente expresado de forma

ubicua en testículos, corazón, hígado, riñón, bazo, próstata y ovarios y presenta una baja expresión en cerebro, pulmón, timo y leucocitos de sangre periférica (46).

4.2 Interacción de Smac/ DIABLO con las IAPs.

La interacción con Smac/DIABLO con las IAPs es capaz de inducir la degradación del primero, debido a la actividad de la proteasa E3 ubiquitina del dominio RING de cIAP-1, cIAP-2 y XIAP (47). Otros resultados indican que a pesar de que XIAP y ML-IAP puede promover la ubiquitinación de Smac/DIABLO *in vitro*, solo la ubiquitinación por cIAP1 y cIAP2 resulta en la degradación de IAP (48). Se ha propuesto que Smac/DIABLO puede ser también regulado por la IAP BRUCE/APOLLON. Bruce contiene un dominio sencillo BIR, y carece de RING, es por ello que el dominio E2 UBC es el que lleva acabo la ubiquitinación del sustrato sin un intermediario de ligasa E3, aunque aún existe controversia acerca de esto. En el artículo de Ceballos G, se demostró que la Survivina, y la isoforma Survivina DeltaEx3 regulan la liberación específica de Smac/DIABLO, durante la apoptosis inducida por daño al DNA, siendo la segunda la que regula en una menor proporción. Adicionalmente, ambas isoformas estabilizan a Smac/DIABLO posterior a su liberación hacia el citosol (49).

Debido a que la proteína madura, capaz de interactuar con las IAPs, se encuentra en la mitocondria, se ha considerado que su liberación mitocondrial es su principal mecanismo de regulación; sin embargo, el grupo de Mc Farlane mostró, que la proteína Smac β , una variante de Smac/DIABLO que carece de la región N- terminal, donde se encuentra el dominio de unión a IAPs, y que se localiza en el citosol, potencia la apoptosis, lo cual sugiere que Smac/DIABLO puede poseer una actividad apoptótica independientemente de su actividad inhibitoria de IAPs (50). Las interacciones entre Smac/DIABLO y las IAPs requieren que el amino terminal del tetrapéptido sea expuesto, lo cual explica porque sólo la forma madura de Smac / DIABLO es funcional en las células (51). A pesar de lo anterior, poco se ha estudiado acerca de los mecanismos regulatorios de Smac/DIABLO y que podrían estar íntimamente relacionados con su desregulación en cáncer.

4.2.1 Mecanismo de liberación de Smac/DIABLO desde la mitocondria.

A pesar de que se sabe que Smac / DIABLO es regulado por las proteínas de la familia de Bcl-2 (52) y por los miembros de la familia de las cinasas activadas por mitógenos como son Erk1/2 (53) y la cinasa del amino terminal c-Jun (JNK) (54), los mecanismos precisos y la cinética de liberación de Smac/DIABLO a partir de la mitocondria no es claro aún. Se ha reportado que

Smac/DIABLO es liberado de forma independiente del citocromo c (55) y de forma simultáneamente con él (56).

Se han propuesto diferentes modelos acerca de la inducción de la apoptosis mitocondrial y su regulación. La mayoría de éstos se han obtenido a partir de experimentos realizados en membranas lipídicas sintéticas con canales dependientes de voltaje (VDAC) reconstituidos bajo la influencia de miembros de la familia de Bcl-2, aunque también se ha trabajado con células cultivadas y mitocondrias aisladas. Los modelos se resumen a continuación:

Los miembros de Bcl-2 forman canales que facilitan el transporte proteico: Se ha sugerido que las proteínas Bcl-2 pueden actuar a través de su inserción, seguida de un cambio conformacional, dentro de la membrana mitocondrial externa, donde pueden formar canales u orificios más grandes. Los miembros de la familia de Bcl-2 pueden insertarse dentro de bicapas lipídicas sintéticas, oligomerizarse y formar canales con ligera conductancia (57).

Los miembros de Bcl-2 interactúan con otras proteínas para formar canales: los miembros de la familia de Bcl-2 interactúan con diversas proteínas. Una posibilidad es que los miembros de la familia pro-apoptica recluten a otras proteínas de la membrana mitocondrial externa formando un poro más grande. Un candidato potencialmente atractivo para este tipo de proteínas es el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC), ya que diversos miembros de la familia de Bcl-2 se pueden unir a este y regular la actividad de sus canales. Este modelo asume que VDAC sufre un cambio conformacional significativo posterior a su unión con miembros de la familia de Bcl-2 (58).

Los miembros de la familia de Bcl-2 inducen ruptura de la membrana mitocondrial externa: Es posible que los miembros de la familia de Bcl-2 controlen la homeostasis de la mitocondria. En este modelo, las señales apoptóticas alteran la fisiología de la mitocondria (por ejemplo, intercambio iónico o la fosforilación oxidativa) tanto que los organelos se ensanchan, dando como resultado una ruptura de la membrana externa y con ello una liberación de proteínas intermembranales hacia el citosol. La homeostasis mitocondrial puede ser influenciada directamente por los miembros de la familia de Bcl-2 o indirectamente por la modulación de otras proteínas mitocondriales (59). La proteína VDAC nuevamente es un candidato prominente para esta regulación ya que es una subunidad del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP), un gran canal que se abre dando como resultado una pérdida del potencial de membrana de forma rápida (60) y un ensanchamiento de los organelos.

4.3 Desregulación de Smac/DIABLO en el cáncer.

En un estudio realizado en células de carcinoma renal se observó por primera vez que los niveles de expresión de Smac/DIABLO se encontraban disminuidos, sin embargo no correlacionaban con

un mal pronóstico. Además, la transfección con esta proteína sensibilizó a las células de carcinoma renal a la apoptosis, inducida por el tratamiento TRAIL-cisplatino (61). Por su parte el grupo de Sekimura y *col.* demostró que en un estudio realizado en 88 muestras de cáncer de pulmón, los niveles de mRNA de Smac/ DIABLO se encontraban disminuidos significativamente en comparación a los tejidos sanos ($p < 0.0001$). En el mismo estudio se demostró que en carcinomas escamosos celulares, los niveles de mRNA de Smac/DIABLO fueron significativamente más bajos que en adenocarcinomas ($p = 0.0072$). Adicionalmente se demostró que la expresión de Smac/DIABLO en los tumores de fumadores fueron menores en comparación con los No-fumadores ($p = 0.0011$). Cabe mencionar que los pacientes con niveles bajos de mRNA de Smac/DIABLO presentaron un peor pronóstico. Estos resultados comprobaron que el nivel de expresión de Smac/DIABLO juega un papel importante en la progresión, pronóstico y carcinogénesis de cánceres primarios de pulmón (62).

Por su parte Kempkensteffen C. y su grupo de trabajo presentaron un proyecto en el cuál se mostró que los niveles de mRNA de Smac/DIABLO decrecían gradualmente a partir del tejido testicular normal hacia el carcinoma testicular y los seminomas hasta los tumores germinales no seminomatosos ($p < 0.001$). De este estudio se concluyó que la expresión del mRNA de Smac/DIABLO se encontraba disminuida en las etapas más avanzadas de cáncer testicular (63). Aunado a los datos presentados por los equipos anteriores, los niveles de expresión tanto de mRNA como de proteína de Smac/DIABLO presentaron baja expresión en carcinomas hepatocelulares en comparación con tejido de hígado normal (64). Sin embargo también hay reportes en donde se ha encontrado lo contrario, que los niveles de expresión de Smac/ DIABLO se encontraban incrementados en tejidos cancerosos, respecto a los tejidos sanos. En el artículo de Espinosa y *col.*, 2004, se observó que los niveles de mRNA de Smac/DIABLO estuvieron por debajo del límite en muestras de tejido cervical normal. Sin embargo, no se presentó una correlación con ninguna variable clínica (65). Por otro lado en el artículo de Arellano y *col.*, se demostró que la expresión de la proteína de Smac/DIABLO correlacionaba positivamente con la densidad microvascular en pacientes con carcinoma de células escamosas del cuello uterino, así mismo se determinó como un marcador potencial de dicha enfermedad. La inmunoreactividad a Smac/DIABLO estuvo correlacionada con recurrencias tempranas (66). Como otro ejemplo, en muestras de pacientes con adenocarcinomas gástricos y de mucosa gástrica no neoplásicos se determinó la expresión del mRNA de Smac/DIABLO encontrando una mayor expresión en los primeros con relación a los segundos (67). Como podemos apreciar, la cantidad de literatura relacionada con la desregulación de Smac / DIABLO en cáncer es amplia; no obstante, poco se ha estudiado acerca de los mecanismos que conllevan a esta desregulación; en particular, la regulación transcripcional.

4.4 Regulación transcripcional de Smac /DIABLO.

4.4.1 Par-4.

El gen del factor de respuesta apoptótica en próstata (*Par-4*) fue originalmente identificado por un mapeo diferencial de los genes que se encontraban sobre-regulados en células apoptóticas de próstata. Subsecuentemente, se encontró que el factor *Par-4* poseía una potente actividad apoptótica en diversos sistemas celulares. Contiene un zipper de leucina en su carboxilo terminal, que es considerado como un dominio de muerte putativo; debido a que es encontrado en otras proteínas involucradas en procesos apoptóticos (68).

En el estudio del grupo Lu C. colaboradores, se reportó por primera vez que el glutamato puede inducir apoptosis en células madre humanas mesenquimales de hueso (hBMSCs) por un mecanismo que involucra al gen proapoptótico Par-4. La neurotoxicidad inducida por glutamato contribuye de forma importante al daño neuronal agudo y en las enfermedades neurodegenerativas. De igual forma observaron que la apoptosis por glutamato era dependiente de la dosis y el tiempo, lo cual fue consistente con estudios previos realizados en células neuronales. Como un factor proapoptótico, Par-4 es identificado como un producto de la sobreexpresión de un gen en células tumorales de próstata que sufren un proceso de apoptosis. Recientemente, ha surgido evidencia clara que muestra que un incremento en la expresión de Par-4 también regula la apoptosis neuronal, especialmente cuando las células son expuestas a insultos metabólicos como son el glutamato y la elevación del calcio intracelular. En este estudio, se demostró que la supresión de la expresión de Par-4 atenuaba de forma importante la apoptosis de las células hBMSCs tratadas con glutamato, mientras que la sobreexpresión de Par-4 incremento el porcentaje de células apoptóticas, con lo que se concluyó que Par-4 juega un papel relevante en la apoptosis inducida por glutamato en hBMSCs. Estos estudios demostraron que la expresión ectópica de Par-4 en hBMSCs resultó en un incremento en la liberación de Smac/DIABLO de la mitocondria y una elevación de sus niveles de mRNA, lo cual sugiere que existe un mecanismo transcripcional previamente no definido para la modulación de Smac/DIABLO mediada por Par-4. Los resultados de este artículo demostraron que el bloqueo endógeno de E2F1 dio paso al decremento de la transcripción de Smac/DIABLO inducida por Par-4, lo que indica que tanto Par-4 como E2F1 son requeridos para la regulación transcripcional de Smac/DIABLO (68).

4.4.2 E2F1.

La familia de factores transcripcionales E2F es la llave reguladora de la proliferación celular, la cual fue descrita por primera vez por la necesidad de la proteína de adenovirus E1A para transactivar al promotor de E2 del adenovirus. Los factores E2Fs controlan el ciclo celular a través de la

regulación de numerosos genes, cuyos productos son requeridos para la progresión del ciclo celular y la entrada a la fase S. De las ocho proteínas E2F identificadas, E2F1 es el miembro mayor caracterizado. La proteína E2F1 promueve el ciclo celular regulando genes involucrados en la replicación del DNA y la transición de la fase G1 a la S. Adicionalmente números estudios han demostrado que la expresión ectópica de E2F1 induce apoptosis por diversos mecanismos y de forma consistente los ratones deficientes en E2F1 presentan defectos en la apoptosis de timocitos y un incremento en la susceptibilidad de desarrollo de tumores (69). En el artículo de Xie y *col.*, 2006, se presentó por primera vez evidencia de que E2F1 puede unirse al promotor de Smac/DIABLO y transactivar su expresión. Dos elementos putativos de unión a E2F1 fueron localizados dentro de la región promotora de Smac/DIABLO, estos fueron BS2 (-542/-535) y BS3 (-200/-193). La transactivación del promotor de Smac/DIABLO por E2F1 tiene su máxima inducción solo cuando BS2 y BS3 actúan en conjunto. La represión de Smac/DIABLO por la técnica de RNA de interferencia (RNAi) atenúo la apoptosis mediada por E2F1, lo cual indica que Smac/DIABLO esta posicionado río abajo de la vía de señalización apoptótica mediada por E2F1. De forma similar, el aumento en la acumulación del factor nuclear E2F1 inducida por 4-hidroxitamoxifem (4-OHT), indujo la proteína de Smac/DIABLO, lo que da como resultado un aumento de la apoptosis mediada por mitocondria. Estos datos sugieren que Smac/DIABLO puede actuar como un gen blanco para E2F1 y contribuir a una nueva vía apoptótica inducida por E2F1 a través de la vía independiente de p53 (69).

4.4.3 Interferon γ (IFN- γ).

El interferon γ (IFN- γ) es un mediador crucial en la inducción de la respuesta mediada por células Th1, pero es predominantemente un regulador negativo de diferenciación y proliferación de células B de ahí, que el interferón γ es una molécula clave en la respuesta humoral o la inmunidad celular. La regulación negativa de las células B se encuentra mediada por la apoptosis: se ha observado que la apoptosis es inducida por el interferón γ en células pre-B inmaduras dependientes de IL7 (70).

En el estudio del grupo de Yoshikawa H. se demostró por primera vez que el interferon γ potenciaba la expresión de Smac/DIABLO endógeno en células WEHI279 y células pre-B normales. De igual forma demostraron que Smac/DIABLO no se expresa en células WEHI279 no estimuladas y en bajos niveles en las células pre-B, sin embargo la expresión se encontraba aumentada en aquellas que fueron estimuladas con el interferon γ . El aumento en la expresión de Smac/ DIABLO promueve la apoptosis. El nuevo mecanismo propuesto por este grupo de trabajo, en donde el interferon γ induce la apoptosis, se da a través de la potencialización de la expresión de Smac/DIABLO en células B y maduras (70).

4.4.4 TNF y ácido fólico.

En el estudio realizado por el grupo de Justo P. se examinaron al microscopio muestras de tejido de riñón de ratón con ARF (*ARF del inglés acute renal failure*) que revelaron la presencia de células epiteliales tubulares con núcleos pignóticos típicos, de la apoptosis; los cuales no estaban presentes en los riñones control. Los ratones inyectados con ácido fólico incrementaron los niveles de expresión de mRNA de Smac/DIABLO a las 24 horas con respecto a los controles. Adicionalmente se observó una acumulación de la proteína de Smac/DIABLO en todo el riñón, sin embargo la histoquímica demostró que Smac/DIABLO estaba expresado en tubos renales y no en glomérulos. Dado que el factor de necrosis tumoral (TNF) es un mediador de la falla renal aguda incluyendo la que está dada por el ácido fólico, este grupo probó la posible contribución de dicha citocina a la regulación de la expresión de Smac/DIABLO en células epiteliales de túbulo proximal (MCT). La apoptosis inducida por TNF fue tiempo dependiente y se apreció desde las 48 -72 horas posterior a la adición de esta citocina. La acumulación de los niveles de mRNA de Smac/DIABLO fue clara posterior a la adición de TNF. La proteína de Smac/DIABLO mostró un patrón bifásico con un decremento al inicio seguido de una sobrerregulación después de 24hrs coincidiendo con el pico de la apoptosis (71).

Este artículo demostró la regulación de Smac/DIABLO en células renales, el cual fue inducido tanto en el riñón completo como en células epiteliales tubulares cultivadas en situaciones asociadas con extensa muerte celular. En células cultivadas TNF indujo la expresión de Smac/DIABLO en una forma tiempo dependiente, por lo que podría ser responsable para la inducción de la proteína y mRNA de Smac/DIABLO in vivo, dado que altos niveles de TNF renal ha sido documentado durante las nefropatías por ácido fólico (71).

5 NF- κ B.

5.1 Características y vías de señalización del factor NF- κ B.

Desde su descubrimiento hace ya 21 años, el factor nuclear- κ B (NF- κ B) ha sido uno de los factores de transcripción más ampliamente investigados debido a su inmensa importancia en la fisiología de los vertebrados y por su aparente desregulación en enfermedades humanas como el cáncer (72, 73). La familia de NF- κ B en mamíferos consiste de 5 miembros: NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), c-Rel, RelA (p65) y RelB. Existen 7 proteínas I κ B; entre las cuales encontramos I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , BCL-3 y las dos proteínas precursoras p100 y p105 (74).

La transcripción dada por NF- κ B es llevada a cabo por la unión de homodímeros o heterodímeros de cinco subunidades de esta familia a los sitios de unión del DNA. La actividad transcripcional

de NF- κ B es enmascarada por su asociación con proteínas inhibitorias de esta familia (I κ B). El paso limitante en la activación de NF κ B es su liberación de las proteínas I κ B las cuales actúan como chaperonas que previenen la unión de NF- κ B al DNA (75).

En su estado inactivo, los dímeros de NF- κ B están asociados con una de las tres proteínas de I κ B ya sea I κ B α , I κ B β o I κ B ϵ , o con el precursor de proteína p100 y p105. La degradación de I κ B es un evento de señalización inducido por la fosforilación específica de IKK. Por el complejo IKK que contiene dos subunidades altamente homólogas, IKK α /IKK1 (CHUK) y IKK β /IKK2 (IKBK β) y una subunidad regulatoria NEMO (modulador esencial de NF- κ B)/IKK γ (IKBK γ). En la mayoría de las vías de señalización canónicas de NF- κ B por ejemplo, río abajo del receptor TNFR1, IKK β es necesario y suficiente para la fosforilación de IKB α en las serinas Ser32 y Ser33 y de IKB β en las Ser19 y Ser23 (76). Cuando se lleva a cabo la fosforilación de estas serinas (Ej.: Ser32 y Ser33 en la IKB α humana), las moléculas inhibitorias IKB son modificadas por un proceso llamado ubiquitinación, el cual las lleva a la degradación por el proteosoma (77). La cascada de señalización que lleva a la activación de NF κ B se despliega en la **Fig. 19**. Por otro lado la vía no canónica o alternativa de NF- κ B se da a través del procesamiento por proteosoma de p100 a p52, liberando así a p52 que contienen los dímeros de NF- κ B que dirigen la respuesta transcripcional que es distinta a la inducida por la vía canónica. Las vías canónicas y no canónicas de NF- κ B regulan distintos grupos de genes blanco (76).

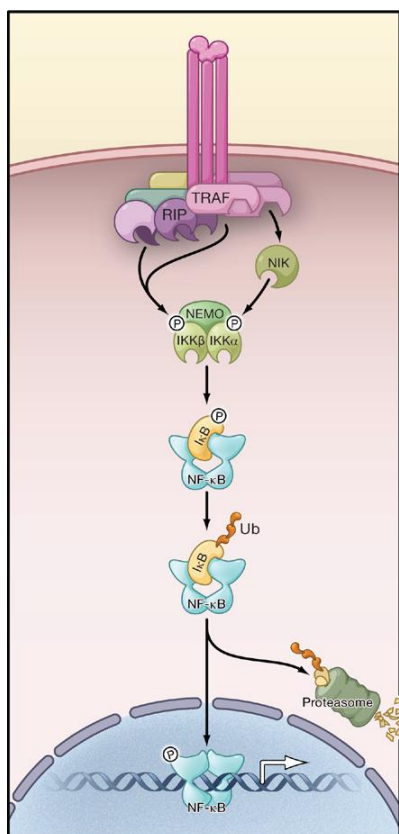


Fig. 19. Activación de NF-κB. Posterior a la unión del ligando al receptor y al reclutamiento de las proteínas adaptadoras al receptor proximal, la señalización de IKK procede a través de los complejos TRAF/RIP, lo que lleva a la activación de la vía canónica o a través de las TRAFs y NIK dando paso a la vía de señalización de NFκB no canónica. La activación de IKK resulta en la fosforilación de IκB y su degradación en la vía canónica o el procesamiento de p100 a p52 en la vía no canónica. Los dímeros e NFκB fosforilados se unen a elementos del DNA con motivos KB e inducen la apoptosis de genes blanco (Tomada y modificada de Hayden M., 2008).

Basado en las evidencias descritas sobre el papel de NF-κB en diversos estudios experimentales y clínicos es evidente que NF-κB juega un papel dual en la supresión de la apoptosis en la promoción de proliferación y la inflamación celular, y está asociada de forma íntima con el desarrollo del cáncer. De ahí que, la vía de señalización de NF-κB se ha vuelto un blanco muy importante para la terapia del cáncer (78).

La habilidad de NF-κB para suprimir la apoptosis y regular la transición del ciclo celular claramente indica que NF-κB puede participar en muchos aspectos de la oncogénesis. De hecho, la elevación de la actividad de NFκB es evidente en diversos tipos de cánceres humanos, incluyendo el cáncer de mama, el carcinoma de pulmón de células no pequeñas, el cáncer de tiroides, las leucemias linfocíticas T o B, el melanoma, el cáncer de colon, el cáncer de vejiga y diversos tumores inducidos vía viral (79).

V. Antecedentes preliminares.

En nuestro grupo de trabajo, la proteína pro-apoptótica Smac/ DIABLO ha sido estudiada ampliamente. En uno de los trabajos publicados; cuyo objetivo fue investigar si la transcripción de Smac / DIABLO podría estar regulada por el AMP cíclico (cAMP), un mensajero secundario, se aisló y analizó el promotor de este gen. Se amplificaron los dos fragmentos de tamaño diferente de la región (1.5 y 3 Kb) 5' no traducida del gen, ambos fragmentos fueron clonados en un vector río arriba del un gen reportero. Para mapear el promotor mínimo, se generaron 13 construcciones de deleciones 5'. Las primeras 9 deleciones mostraron pequeños incrementos en la actividad con respecto a las construcciones que tenían el promotor de 1.5 o 3 Kb. Las deleciones 10 a la 12 presentaron mayor actividad transcripcional que el resto de las construcciones. Debido al incremento tan significativo de la actividad transcripcional del promotor de Smac/DIABLO a partir de la deleción 9, se propuso la existencia de un posible represor transcripcional en esta región del promotor que estaría regulando a Smac/DIABLO.

Adicionalmente, datos no publicados de nuestro grupo sugerían que el factor NF- κ B regulaba la expresión de Smac/ DIABLO, por lo que también se decidió estudiar la participación de este factor transcripcional en la regulación de Smac/DIABLO; para ello se usaron líneas celulares que contenían la vía de NF- κ B alterada, a las cuales se les midió de forma semicuantitativa los niveles de RNAm de Smac/DIABLO.

VI. HIPÓTESIS.

- En la región promotora (-625/-726) de Smac/DIABLO actúa un represor transcripcional.
- El factor NF- κ B regula la expresión de Smac/DIABLO a través de su unión al promotor de este gen.

VII. OBJETIVOS.

1. Objetivo General.

Analizar la región promotora de Smac/DIABLO. Identificar factores transcripcionales que regulen la expresión de Smac/DIABLO.

2. Objetivos específicos.

1. Caracterizar la región promotora de Smac/DIABLO en donde al parecer reside un silenciador transcripcional.
2. Realizar una búsqueda de los factores de transcripción que interactúan en la región de interés del promotor de Smac/DIABLO.
3. Identificar al silenciador transcripcional que actúa en la región promotora de Smac/DIABLO.
4. Determinar los niveles de RNAm de Smac/DIABLO en líneas celulares con la vía de NF- κ B alterada.
5. Realizar una búsqueda de sitios de unión para el factor NF- κ B en la región promotora de 1.5Kb de Smac/DIABLO.
6. Establecer un modelo de activación de NF- κ B para determinar su participación como regulador transcripcional de Smac/DIABLO.

VIII. MÉTODOS.

1. Líneas celulares.

HeLa: Línea celular derivada de adenocarcinoma epitelial de cérvix, procedente de mujer negra de 31 años. Esta línea contiene el virus del papiloma humano tipo 18 y una baja expresión de niveles de p53 y normales para el gen supresor de retinoblastoma (pRB). ATCC:CCL-2

HeLa NFkB new: Línea celular HeLa transfectada de forma estable con el vector pHTS (*Biomyx*) que contiene 5 sitios de reconocimiento para NF- κ B.

CaLo. Línea celular derivada de una biopsia de cáncer cervicouterino.

CaLoIKK. Línea celular de cáncer cervicouterino transfectada de forma estable con un vector que sobreexpresa IKK y por tanto NF- κ B se encuentra activo constitutivamente.

MDA-MB 231. Línea celular derivada de adenocarcinoma epitelial de mama, procedente de mujer caucásica de 51 años. Expresa los receptores del factor de crecimiento epidermal (EGF) y el factor de crecimiento transformante alpha (TGF alpha). ATCC: HTB-26.

MDA-MB231-S32. Línea celular derivada de adenocarcinoma epitelial de mama, transfectada con un vector que expresa IKB con una mutación en la serina 32, lo cual evita su fosforilación y de esta forma mantiene secuestrado a NF- κ B en el citosol inhibiendo su actividad de forma estable.

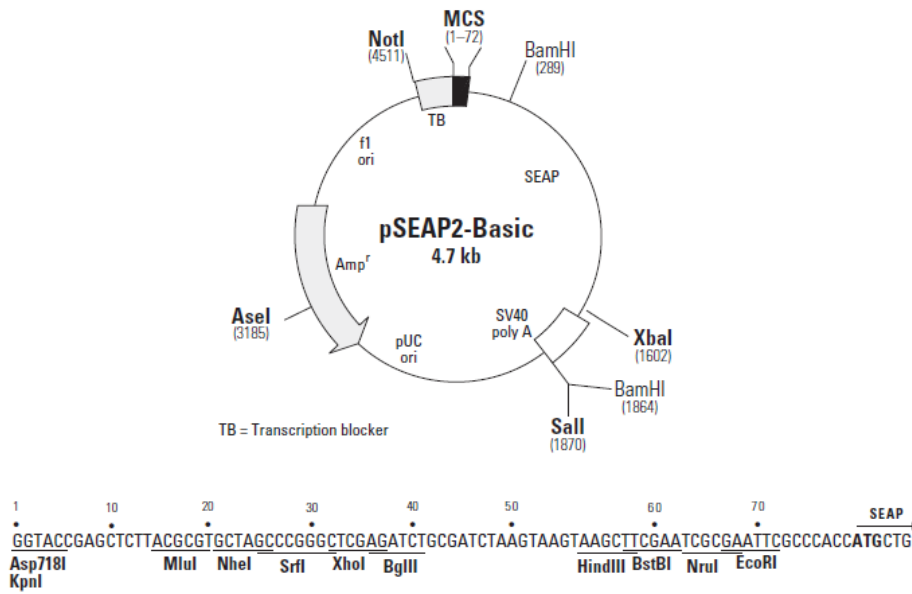
HEK293: Línea celular derivada de riñón embrionario humano. Esta línea celular contiene adenomavirus tipo 5 ATCC: CRL-1573

1.1 Cultivo celular en monocapa.

Las líneas celulares se cultivaron en medio DMEM (medio modificado Dubbelco, el cual contiene aminoácidos y vitaminas), suplementado con 5% de suero fetal bovino y 3% de antibiótico (estreptomina). Las células fueron incubadas a 37° C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ (v/v).

1.2 Vectores utilizados.

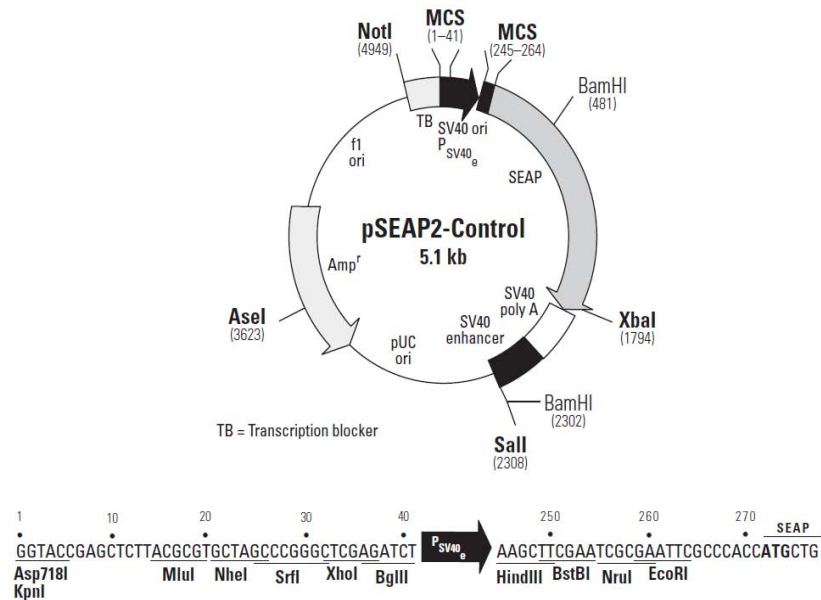
pSEAP2-Basic. Este vector carece de promotor eucarionte y secuencias enhancer y tiene un sitio de clonación múltiple que permite la inserción de fragmentos de DNA de promotores putativos río arriba del gen de la fosfatasa alcalina secretada (SEAP).



pSEAP-Control. Es un vector de control positivo que expresa fosfatasa alcalina secretada (SEAP), bajo el control de un promotor y un enhancer SV40.

GenBank Accession No: U89938

Cat. Nos. 631717 & 631735



pHTS-NF- κ B. Contiene 5 sitios de unión para NF- κ B río arriba del gen luciferasa (Luc), que funciona como gen reportero, pues emite luminiscencia al activarse la transcripción de éste dada por la estimulación de los sitios de unión a NF- κ B.

2. Miniprep.

Para la extracción de los plásmidos se seleccionaron de 3 a 5 colonias a las cuales se les realizó el miniprep correspondiente. Los plásmidos se extrajeron utilizando el método de lisis, desnaturalización y neutralización con el Kit Miniprep Express™ Matrix (*Q-Biogene*); la integridad del DNA se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

3. Digestión con enzimas de restricción.

Se digirieron los plásmidos con las endonucleasas EcoRI y Xho I en el Buffer NEB2 y se incubaron por 2 horas a 37°C, posteriormente se incubaron a temperatura ambiente durante toda la noche y se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

4. Búsqueda de factores transcripcionales putativos.

Para determinar los posibles factores transcripcionales que podrían estarse uniendo a la región promotora de Smac/DIABLO, se alineó la secuencia de interés en el programa *Ensembl* y posteriormente se realizó el análisis *in silico* con los programas TESS, <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>, ChipMapper <http://www.mapper.chip.org/> y Genomatix http://www.genomatix.de/genome_analyzer.html.

5. Mutagénesis.

Para llevar a cabo las mutaciones específicas de los sitios de unión tanto de AP2 α como de AML1 se empleo el kit de *Stratagene QuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis* Fig. 4.

En este proceso se utilizó un plásmido de doble cadena de DNA (dsDNA) con el inserto de interés. Los primers complementarios a las hebras del vector se extendieron en una PCR con ayuda de la polimerasa Pfu I Ultra HF, sin que hubiera un desplazamiento de los primers. La extensión de los primers generó un plásmido mutado con “nicks”. Posterior a diversos ciclos de temperaturas, el producto fue tratado con la enzima Dpn I. La endonucleasa DpnI (secuencia blanco 5'-Gm6ATC-3') es específica para DNA hemimetilado y metilado, y fue empleada para digerir al DNA templado parental y para seleccionar el DNA sintetizado con la mutación deseada. El vector “nickeado” que contenía la mutación fue posteriormente transformado en bacterias competentes XL10-Gold, con lo que se aseguró la replicación completa del vector.

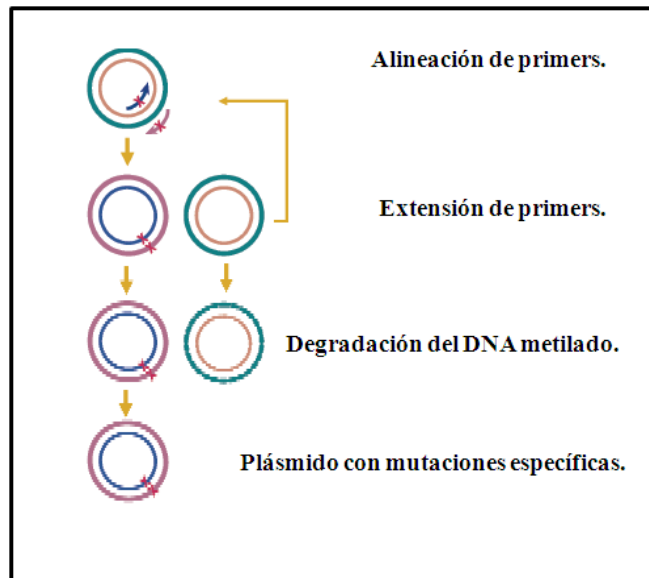


Fig. 4. Mecanismo de mutagénesis dirigida para obtener los plásmidos pSEAP-Basic/Smac/DIABLO1.5Kb- Δ -8-MUT AP2 alpha, pSEAP-Basic/Smac/DIABLO1.5Kb- Δ -8-MUT AML1, con las mutaciones en la región de unión específica para los factores transcripcionales AML1 y AP2 alfa.

6. SNAP MiniPrep Kit (*Invitrogen*).

Para corroborar que la transformación de las bacterias con las construcciones fue correcta se seleccionaron cinco colonias (para cada construcción), se crecieron en medio LB/ampicilina y se incubaron durante 7 hrs en movimiento a 37°C. Las bacterias fueron empaquetadas, resuspendidas y lisadas en los buffers indicados en el kit del fabricante (*Invitrogen*).

El sobrenadante se colocó en un tubo limpio y se le agregó el buffer de unión, este fue pipeteado en la columna SNAP; la cual está formada por la columna A sobre un eppendorff B. Posterior a un paso de centrifugación, se lavó la columna con el buffer apropiado. Finalmente se centrifugó la columna a máxima velocidad a temperatura ambiente. Se eluyó el plásmido agregando agua MilliQ a la columna de SNAP. Este protocolo presenta la ventaja de extraer el DNA de una forma más pura, dada la ausencia de alcoholes que alteran la correcta lectura de la secuenciación.

7. Secuenciación.

Para corroborar que la región promotora de Smac/DIABLO de interés presentaba las mutaciones de los nucleótidos específicos en el vector pSEAP-Basic, se envió a secuenciar el plásmido a la Unidad de Secuenciación e Identificación de Polimorfismos del INMEGEN, la cual emplea un secuenciador de *Applied Biosystems* (AB) modelo 3730 XL.

Se utilizó el siguiente primer para secuenciar:

Forward: MCS 5'CTAGCAAAATAGGCTGTCCC 3'

8. MidiPrep.

Para llevar a cabo la propagación de los plásmidos y posteriormente poder realizar las co-transfecciones en las líneas celulares, se realizaron los preinóculos con las bacterias transformadas exitosamente. Se crecieron las bacterias en medio LB/ampicilina y se incubaron durante 7 hrs en movimiento a 37°C. Se inocularon 50 µl del pre-inóculo en un matraz con 500 ml de medio LB/ampicilina. El cultivo se dejó durante toda la noche en movimiento a 37 °C. Se congeló una alícuota de cultivo de bacterias (glicerol al 20 %).

Los plásmidos se extrajeron utilizando el método de lisis, desnaturalización y neutralización del Kit PureYield Plasmid Midiprep System y (*Promega*), así como el midiprep por columnas utilizando el Kit Hispeed Midi Prep (*QIAGEN*), el cual separa el material genético por adhesión, una vez que el plásmido se adhiere a la columna, éste se eluye. Este kit se empleó únicamente para purificar los plásmidos con los cuales se realizaron las cotransfecciones. Una vez obtenidos los plásmidos fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

9. Cotransfección.

Se sembraron en monocapa 62,500 células HeLa por pozo en cajas de 24. Se transfectaron 24 horas después con el vector pSEAP control (sobrexpresada fosfatasa alcalina), vector pSEAP-Basic (vacío), y con el vector pSEAP-Basic/1.5KbSmac/DIABLO/-Δ-8, así como pSEAP-Basic/Smac/DIABLO1.5Kb-Δ-8-MUT AP2 alpha, pSEAP-Basic/Smac/DIABLO1.5Kb-Δ-8-MUT AML1, cada uno de los pozos se cotransfectó con el vector pβgal-control a una relación 5:1 con Lipofectamina 2000 (*Invitrogen*). El DNA se mezcló con la lipofectamina 2000 en medio sin suero y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. La mezcla anterior se agregó a cada uno de los pozos y se dejó incubar por 6 horas a 37 ° C, posteriormente se cambió por medio con suero al 5%, las células fueron incubadas por 48 horas a 37 ° C.

10. Ensayo de gen reportero.

Para determinar los cambios en la actividad transcripcional en cada una de las transfecciones, se midieron los niveles del gen reportero. Lo anterior fue posible, debido a que todas las clonaciones empleadas fueron realizadas en el vector pSEAP-Basic. Este vector se caracteriza por contener su sitio de clonación río arriba del gen de la fosfatasa alcalina secretada (SEAP).

Se cuantificó la fosfatasa secretada total por pozo, 48 hrs después de la transfección, empleando el kit Great Escape 2.0 (*Clontech*). Se tomaron 25ul del medio de cada pozo y se colocaron en placas de 96 pozos, se les agregó 75 ul del buffer de dilución 1X y se incubaron las muestras a 65 ° C por 30 minutos, posteriormente se dejaron enfriar a TA y se les agregó 100 ul de la solución de

Sustrato SEAP, se incuban por 30 minutos a TA y finalmente se leyeron las muestras en el lector de Elisa Multimode Detector (*Beckman Coulter, modelo DTX 800/800*), a una longitud de onda de 260nm.

Posteriormente se retiró el medio de cultivo de los pozos que contenían las células, y se lavaron dos veces con medio PBS 1X, evitando que se secaran. Se adicionaron 500 μ l. del buffer de lisis 1X PLB preparado previamente del kit *Dual Luciferase Reporter Assay (Promega)*. Las células fueron desprendidas por agitación durante 15 min. y con la ayuda de un “scraper”. Se transfirió el lisado celular a viales nuevos.

Como un control adicional se normalizaron los valores de β -galactosidasa respecto a la cantidad de proteína total por pozo, utilizando el kit RC DC Protein Assay (*BIO-RAD*). El ensayo anterior se realizó por triplicado en tres experimentos independientes.

11. Cuantificación de β gal.

Debido a que se empleó un reportero para monitorear los efectos de una secuencia promotora en la expresión de un gen, el nivel de la expresión del gen reportero fue normalizado para eliminar la variabilidad que se pudiera haber obtenido a partir de las diferencias en la eficiencia de la transfección o en la preparación de los extractos celulares. Los datos de SEAP obtenidos fueron normalizados respecto a los valores arrojados de la lectura de la β -Galactocidasa (β gal-control) que expresa constitutivamente una actividad enzimática luminiscente captada con la ayuda del kit Luminescent β -gal Reporter System 3, Detection Kit II (*Clontech*). Se alicuotaron 20 μ l de extracto celular de cada uno de los pozos co-transfectados y se incubaron con 100 μ l de la solución Reaction Buffer + Buffer Substrate (98 μ l+ 2 μ l) durante 1 hora a temperatura ambiente, por último las muestras se leyeron en el lector de Elisa (*Beckman Coulter, Multimode Detector*) con 10 seg de integración.

12. Cuantificación de proteínas.

Como un control adicional en la normalización de los datos, se cuantificó la cantidad total de proteína presente por cada pozo de cada placa. Para ello, se utilizó el kit de *BIORAD, DC Protein Assay*. De forma general y siguiendo el protocolo proporcionado por esta empresa, se pipetearon 5 μ l. de la solución PBS 1X que contenía el lisado celular de cada pozo estudiado en una microplaca. Posteriormente, se adicionaron 25 μ l del reactivo A' (A+ S), así como 200 μ l del reactivo B y se agitó brevemente. Después de 15 minutos se midieron las absorbancias emitidas a una longitud de onda de 750 nm. Finalmente, para obtener los valores de concentración de proteína total por pozo, se realizó la regresión lineal correspondiente, ajustando los valores a la curva estándar realizada previamente en cada experimento.

13. Prueba estadística.

Se realizó la prueba estadística de U de Mann-Whitney-Wilcoxon para determinar la significancia de los factores AP2 α y AML1, en la regulación de la actividad transcripcional del promotor de Smac/DIABLO. El intervalo de confianza (IC) fue del 95%.

14. Extracción de RNA total.

El RNA total se extrajo de las células, con Trizol (Invitrogen). Dichas células se homogenizaron con trizol, se les agregó cloroformo, se centrifugaron y se precipitó la fase acuosa con isopropanol. Se cuantifico el RNA por espectrofotometría y se determino su integridad con una relación 260/280.

15. RT-PCR.

La síntesis se hizo a partir de 1 μ g de RNA total usando hexámeros al azar y la enzima transcriptasa reversa termoestable del kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) de la siguiente manera: 1 μ g de RNA total se desnaturalizó a 65°C durante 5 minutos, se agregaron hexámeros sintetizados al azar, deoxinucleótidos y enzima transcriptasa reversa en el buffer adecuado. Se incubó por 50 minutos a 50°C, la reacción se paró a 85°C y se incubó durante 20 minutos a 37°C con RNAsa H. La expresión del ARN mensajero se normalizó con la expresión de Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

El ADN complementario se amplificó con deoxinucleotidos (dNTPs), buffer, enzima polimerasa ADN termoestable y primers específicos para el gen de interés.

Las condiciones para este ensayo son: 2.5 unidades de polimerasa Amplitaq, 2 mM de deoxinucleótidos, 10 picomolar de primers y 1.5 mM de MgCl₂.

15.1 Oligos y condiciones.

Smac/DIABLO.

Sentido: 5` GCGCGGATCCATGGCGGCTCTGAAGAGTTGGCT 3`

Antisentido: 5` AGCTCTCTAGACTCAGGCCCTCAATCCTCACGC 3`

El fragmento esperado fue de 752 pb para Smac/DIABLO alfa.

Condiciones.

95° C	95° C	72° C	95° C	68° C	72° C	72° C	4° C
10´	30´´	2´	30´´	30´´	1´	5´	∞
1x	3x		30x			1x	∞

GAPDH.

Sentido: 5´ CCCCTTCATTGACCTCAACT 3´

Antisentido: 5´TTGTCATGGATGACCTTGGC3´

El fragmento esperado fue de 400 pb.

Condiciones.

95° C	95° C	60° C	72° C	72° C	4° C
10´	30´´	30´´	30´´	5´	∞
1x	30x			1x	∞

16. Extracción de DNA genómico.

Para llevar a cabo la amplificación del promotor de Smac/ DIABLO, se extrajo el DNA genómico de una muestra de sangre periférica con ayuda del kit *QIAmp DNA de Qiagen*. Se pipetearon 20 µl de la proteasa QIAGEN en el fondo de un tubo eppendorff, se le agregaron 200 µl de sangre periférica, así como 200 µl del buffer AL y se agitó la muestra por algunos segundos. Se incubó la solución por 10 minutos a 56° C. Posteriormente fueron adicionados 200 µl de etanol y se agitó. Se colocó la solución anterior en la columna QIAmp y se centrifugó, se agregaron 500 µl del buffer AW1 y se centrifugó de nuevo. Se añadieron 500 µl del buffer AW2, centrifugandose. A la columna se le adicionaron 200 µl de agua destilada y se dejó incubar por 5 min., se centrifugó. Finalmente se obtuvo el DNA y se analizó su pureza y concentración en un espectofotómetro.

17. PCR anidado.

Para amplificar las 1500 pares de bases del promotor de Smac/ DIABLO, se llevó a cabo un PCR anidado. Para un primer PCR se emplearon los oligonucleótidos *sentido* Prom1bre y el oligo *antisentido* Prom2bre, mientras que en el segundo; donde se utilizó como templado una muestra del primer PCR, se utilizó nuevamente el oligo *sentido* Prom1bre y el antisentido DIABLO GSP1.

Promotor de Smac /DIABLO.

AmpliTaq	1.5 U
Buffer 10x	10x
PROM1bre	0.5 μ M
DIABLO GSP1	0.5 μ M
dNTPs	0.05 μ M
H ₂ O	Aforar a 25 μ l
DMSO	5%
DNA	100ng/ μ l
Total	25 μ l

Oligos.

Prom 1bre.

Sentido: 5' CCGCCTCTCGAGGGAACGCCTGTGCGCAGCTCCCTG 3'

Prom2bre.

Sentido: 5' GAGCCGAATTCGTGCAGCGCGCGGACGCCAGACGC 3'

DIABLO GSP1.

Antisentido: 5'TCG GTTGAGAAGTCTCGGCGGTA 3'

Amplificó un fragmento de 1500 pb.

Condiciones.

95° C	95° C	68° C	72° C	72° C	4° C
10'	1'	4'	3'	20'	∞
1x	30x			1x	∞

Una vez amplificado el fragmento de Smac/DIABLO con las condiciones antes mencionadas, se tomó 1µl de la reacción y se realizó otra PCR; bajo las mismas condiciones, con excepción del primer antisense, que en este caso se empleó Prom2bre. De esta forma se realizó un PCR anidado.

18. Purificación de DNA a partir de gel de agarosa.

Para llevar a cabo la purificación del DNA a partir del gel se utilizó el kit de extracción *QiaQuick* de la marca QIAGEN. A continuación se describe brevemente el protocolo.

Se cortó el fragmento de gel que contenía la banda de DNA de interés y se pesó en un tubo eppendorf, se le agregaron 3 volúmenes de Buffer QG por cada volumen de gel y se incubó a 50 ° C durante 10 minutos, hasta que se disolvió completamente, se le agregó un volumen de isopropanol y se mezcló la solución.

Se colocó la solución anterior en la columna QiaQuick y se centrifugó por un minuto, descartándose el sobrenadante. La columna se lavó con 0.75 ml de buffer PE y se centrifugó por un minuto, de nuevo se retiró el sobrenadante y la columna fue centrifugada a máxima velocidad por un minuto adicional. Por último se le agregó a la columna 30 ul de H₂O milli Q para eluir el DNA y se centrifugó a máxima velocidad por un minuto. Se cuantificó el DNA por espectrofotometría y se determinó su integridad con una relación 260/280.

19. Clonación del fragmento de 1.5KB del promotor de Smac/DIABLO en el vector pTZ57-RT.

El laboratorio contaba con los oligos específicos para amplificar la región promotora de 1.5 KB de Smac/DIABLO. Se realizó un PCR anidado y el producto amplificado fue purificado del gel y mandado a secuenciar. Una vez comparada y confirmada la secuencia amplificada; respecto a la secuencia proporcionada con el NCBI, se realizó la clonación. El fragmento de 1.5Kb de Smac/DIABLO se clonó en el vector pTZ57-RT (*InsTAclone*), el cual permitió la obtención de una mayor cantidad de dicho inserto.

Las ligaciones se realizaron con la enzima T4DNA del kit *InsTAclone (fermentas)*, empleado las relaciones 1:3 vector-inserto (pTZ57-RT -1.5Kb Smac/DIABLO), tomando como referencia 100ng del vector. La reacción se incubó a 4° C durante toda la noche.

Por otro lado se preparó la solución de transformación T (A+B), siguiendo las indicaciones del fabricante kit *Bacterial Transformation TransformAid™ (fermentas)* la cual fue adicionada a las bacterias, seguida por un choque térmico. Las bacterias transformadas se plaquearon en agar LB/ampicilina y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Para confirmar el éxito de la clonación se seleccionaron diversas colonias al azar, a las que se les extrajo el plásmido por la técnica de Miniprep y se realizaron digestiones con enzimas específicas.

20. Clonación del fragmento de 1.5KB del promotor de Smac/DIABLO en el vector pSEAP-Basic.

Una vez que se obtuvo la cantidad suficiente de inserto (1.5Kb del promotor de Smac/DIABLO), se realizó la clonación en nuestro vector de interés, es decir el pSEAP- Basic, el cual fue linearizado con enzimas de restricción para poder llevar a cabo la ligación (ya que este es proporcionado por el fabricante circularizado), y posteriormente la transformación de bacterias DH5 alfa. Este vector se caracteriza por contener su sitio de clonación río arriba del gen de la fosfatasa alcalina secretada (SEAP), la cual es liberada al medio celular una vez activada la transcripción.

Para llevar a cabo las ligaciones se utilizó la enzima T4DNA del kit *InsTAclone (fermentas)*, empleando las relaciones 1:3 vector-inserto (pSEAP- Basic -1.5Kb Smac/DIABLO), tomando como referencia 100ng del vector. La reacción se incubó a 4° C durante toda la noche. Se empleo el mismo método previamente descrito para ambas transformaciones y ligaciones.

21. Cuantificación de luciferasa.

Para este ensayo se empleó el kit *Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega)*, el cuál permite obtener las lecturas de la luciferasa de forma eficiente. Únicamente se colocaron 20µl. de las muestras de células resuspendidas en buffer PLB, en los pozos de la placa de ELISA. Posteriormente se adicionaron 100µl del reactivo LAR II, incluido en el kit y se resuspendió perfectamente. Inmediatamente se leyeron en el equipo de Elisa Multimode Detector (*Beckman Coulter, modelo DTX 800/800*), a una longitud de onda de 420 nm. con 10 seg de integración.

IX. RESULTADOS.

1. Caracterizar la región promotora de Smac/DIABLO en donde al parecer reside el silenciador transcripcional.

En nuestro grupo de trabajo se contaba con diversas construcciones realizadas en el vector pSEAP-Basic, que consistían en deleciones subsecuentes del promotor de Smac/ DIABLO de aproximadamente 100pb cada una. A través de ensayos de gen reportero se cuantificaron los cambios en la actividad transcripcional de las mismas, en la mayoría no hubo cambios, con excepción de las deleciones 9 y 10 donde se observó un incremento importante en la transcripción (**Fig. 5**). Estos resultados sugieren la presencia de un elemento de unión para un represor en la región analizada.

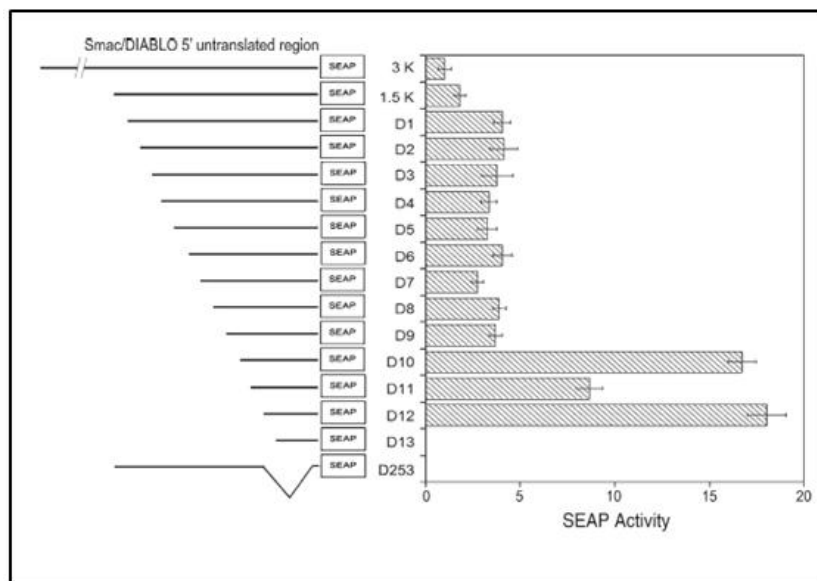


Fig.5 Variación de la actividad transcripcional de la región promotora de Smac / DIABLO con deleciones subsecuentes. La actividad transcripcional aumenta de forma importante entre las construcciones 8, 9 y 10 respecto a las demás construcciones. (Tomada de Martínez M. y col. 2007).

Para identificar al posible represor se caracterizó la región promotora de Smac/DIABLO en donde al parecer residía el silenciador transcripcional. Lo anterior se realizó a través de la propagación de las construcciones 8, 9 y 10 del promotor de Smac/DIABLO (realizadas con anterioridad en el grupo de trabajo (ver referencia 95). En la **Fig. 6** se puede observar el gel de agarosa al 1.5 % en donde fueron corridas las muestras de DNA.

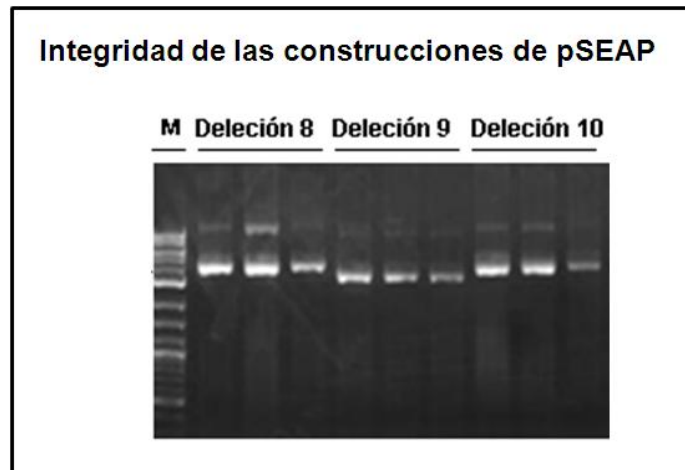


Fig.6 Electroforesis de las construcciones 8, 9 y 10.

Para verificar que dichas construcciones coincidieran con las reportadas con anterioridad, se decidió digerir las muestras con las enzimas de restricción EcoRI, que linearizaba los plásmidos y BamHI que llevaba a cabo dos cortes. En el gel de la Fig. 7 se pueden observar distintas bandas, que coinciden con el patrón esperado, es decir, una banda de 6.2 Kb para el caso de EcoRI, que corta una sola vez y por tanto lineariza el plásmido pSEAP, y dos bandas para la enzima BamHI que corresponden a 4Kb y a 2.6 Kb. Para confirmar la integridad de las construcciones, éstas fueron secuenciadas.

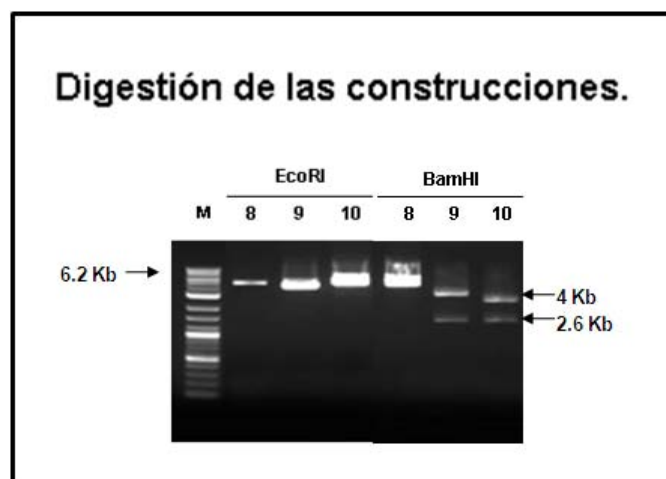


Fig.7 Digestión con enzimas de restricción EcoRI y BamHI de las diferentes construcciones. En ambos casos se observaron las bandas esperadas.

1.2 Secuenciación de las construcciones.

En la **Fig. 8A** se puede apreciar el resultado de la secuenciación de las construcciones que contienen las deleciones 8 y 10 únicamente. La secuenciación de la construcción 9 no coincidió con lo reportado previamente; al parecer, esta clona recombinó de forma diferente. Como resultado se decidió trabajar a partir de éste momento únicamente con la construcción 8 y 10, sin afectar al proyecto en lo absoluto, puesto que la deleción 8 incluye a la 9, y sus valores de actividad transcripcional son muy similares. En la **Fig. 8B** se muestra la región diferencial entre la deleción 8 y 10, que es de 102 pares de bases, a partir de la cual se realizó el análisis *in silico*, con el cual se determinaron los posibles factores de transcripción que podrían estarse uniendo a esta región del DNA y regular de ésta forma la actividad transcripcional.

A. Deleción 8.

```
NNNNNNNNNNNNNNNNANTTTCTCTATCGNTCTCCAGTGTAACC GAGAAGC GAGC GTCCA GGAGGCTGTTGGGGAGGTCGGC
ACTGTGGGCTTCTGGCCATCGTTTGCTGTTTCGAGGGCCA GGACCTC GTGTG TTC CCGTCCGCCCTCTGGGACGGC GCCAGCCC
GGCAGGCCGCCGACCGTCTGGGGCTC CCGCG CAGCGCGATGCCG GCCTCGTCCACCGTCCACGCTGCTGACGCTGCTGCGG GAGC
TGCTCGCCTTCTGCTCTCTCAGCTACACGGTCTCATCGGGGC GCTGCTGCTGGCCGGCTGGACCACTTACTTCTGGTGTGAGGT
GACAGCGCCGTCGCCGCGCCCGGCCCGCCCCGCGCGGAAGTTCGCGCGTGGTTGCCTTGCGCGGCCGTTACAGCCTTTGCCCT
AAGCCTCGCCCCCTTCCCTGCTGCTGCCAATCCCGACTGCTTCCCTGGGTGGGGCGTGGCTATGGGCGAGGC GCTCTCAGATG
GAGGCCGTGCCCCGCTCCGCGCTACGAAGCTGCGTCACTCCGCGGTGTGCTGTCGCGTCCGCGCGCTGCAC GAATTCGCCCAC
CATGCTGTGCTGCTGCTGCTGGCCTGANGTACAGCTCTCCCTGGGCATCATCCAGTTGAGGAGGAGAACC CGACTTCTG
GAACCGCGAGGCA GCCGAGGCCCTGGGTGCCGCC NAGAA GCTGCA GC CTGCA CAGACAGCCGCCAAGAACCTCATCATCTCTG
GGCGATGGGATGGGGGTGTCTACNGTGACAGCTGCCA NGNTCTAAANGGNCAANAANAANNA CAAACTGGGGCCTGANATA CCC
CTGNNATGGACCGCTTCCCATATGTGCTCTGTCCNAGACATACANTGTANNNAANCATGTGCCANANNNGN NCCACANCCA
CGGNNANNCNGTGNNGG NNA NGG NCA NCTTNCNNANCATNNGNTNGN NNGCANCN NCCNGNTTNNCN NNGCN NNC
NNNACGNNNNNN NGNCATNN NNCNN NATNA NNNNN NNN NNA NNNNNG NNNNCAN NGGNN NNN NACNNNC NNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
```

Deleción 10.

```
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
ACCGTCTGGGGCTCCCGCGCAGCGCGATGCCGGCC TCGTCCACCGTCCACGTGCTG CAGCTGCTGCGGGAGC TGCTCGCC TCGT
GCTCCTCAGCTACACGGTCTCATCGGGGC GCTGCTGCTGGCCGGCTGGACCACTTACTTCTGGTGTGAGGTGACAGCGCCGTCG
CCGCGCCCGCCCCGCCCGCGCGGAAGTTCCGGCGTTGGTTGCC TTGC GCGGCC GTTACAGCC TTTGCC TAAGCCTCGCCCCCT
TTCCCCCTGCCTGCCAATCCCGACTGCTTCC TTGGGTGGGGC GTG GCTATGGGCGAGGC GCTCAGATGGA GGCCGTGCCCC
GCTCCGCGCTCACGAAGCTGCTCACTTCCGGC GTGTGCTGCTGGC GTCCGCGCTGCA CGAATTCGCCACCATGCTGCTGCTGC
TGCTGCTGCTGGGCTGANGCTACAGCTCTCCTGGCATCATCCAGTTGANGAGGAGAACCCGGACTTCTGGAAACCGCAGGCA
GCCGANGCCCTGGGTGCCGCAAGAAGCTGCAGCTGCACAGACAGCCGCCAAGAACCTCATCATCTTCTGGGCGATGGATGG
GGGTGTCTACNGACAGCTGCCAG NATCCTAAAAGGGCAGAAAGAANGACAAACTGGG GCCTGAGATACCCCTGNCATGGACCG
CTTCCCATATGTGCTCTGTCCNAGACATACAATGTAGANAACATGTGCC NNACAGNGNAGCCACANNC NCGNCNA NCTGTGCN
GNNNNNANGGN NCTCCANAACCAN NNNTN GAGTGCNNNC NCCNNTTTAANCA NNGNAACNNGANN NNCNNNNNN
NGGNNNNNTCN NNNNNNNNAATNN GNNNNNAAANCNN.
```

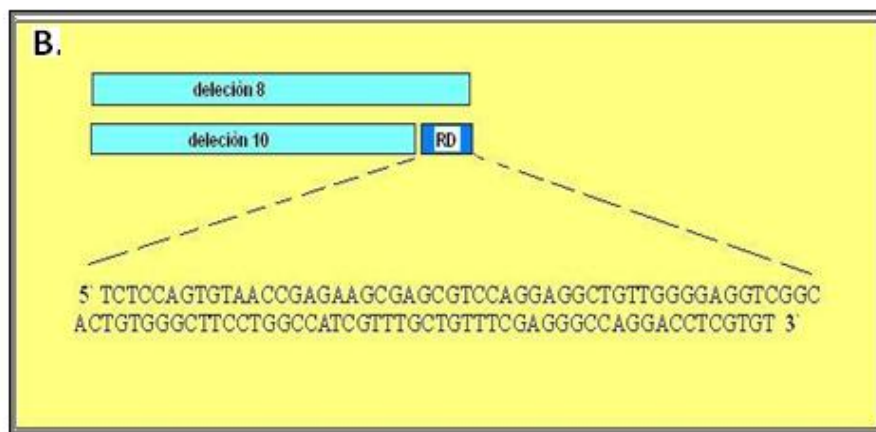


Fig. 8. A) Secuencia de las construcciones 8 y 10. En verde se observan las 102 pb diferenciales ente la delección 8 y 10, en anaranjado se observa el resto de las pares de bases compartidas. B) Esquema que muestra la región diferencial entre la secuencia 8 y 10.

2. Realizar una búsqueda de los factores de transcripción que interactúan en la región diferencial del promotor de Smac/DIABLO.

Una vez determinada la región diferencial, se inició la búsqueda de los factores transcripcionales que pudieran estarse uniendo a dicha región de DNA. Para cumplir con dicho objetivo, se utilizaron 3 softwares bioinformáticos: Genomatix, TESS y ChipMapper. Todos los softwares son de libre acceso y son amigables con el usuario. A partir del análisis bioinformático se recopilaron los datos y se compilaron en una tabla, para así visualizar las coincidencias de los factores putativos entre cada uno de los programas. Adicionalmente se presentan las secuencias con las que estos factores tienen mayor afinidad, así como las probabilidades (score) que presentan para unirse a ellas (**Tabla 1**).

Los programas arrojaron diversos factores; no obstante se decidió refinar la búsqueda de los mismos y de esta forma acotar la gama de las posibles secuencias a mutar. Para ello se alineó la región diferencial de 102 pares de bases en el programa *Ensembl* con 9 especies de mamíferos. De esta forma se apreciaron las regiones más conservadas de dicha secuencia. En términos biológicos, el que una región este conservada a lo largo de la escala filogenética, sugiere que dicha región presenta una función biológica relevante.

En la **Fig. 9** se observan dos regiones conservadas principalmente, obtenidas de la alineación de la región de interés. Esta región fue empalmada con los resultados arrojados por el software TESS, el cual nos indicaba la región exacta la que se estaba uniendo cada uno de los factores putativos, como se aprecia en la figura referida.

Tabla 1. Factores putativos que se unen a la región diferencial de 102 pb del promotor de Smac/DIABLO determinados en tres diferentes Softwares: TESS, Genomatix y ChipMapper.

Factor de transcripcion	Genomatix	TESS (Score)	ChiP Mapper (Score)
Elk-1	●	● (10.35)	
AP-2 <u>alpha</u>		● (12)	
C-Ets-2,1	●	● (11)	● (11,18)
AML1 <u>ε</u>		● (12)	● (10)
T-Ag		● (10)	
<u>ε-Ets -1</u>		● (12)	● (9)
TCF-2 <u>alpha</u>		● (14)	
EBP-45		● (10.2)	
HES-1		● (12)	
CTCF		● (10)	
PEA3		● (10.16)	
ZEB1, ZEB2	●		
NKX3-2	●		
HMX1,2	●		
IRF1,2	●		
ELF1,2	●		
MYBL2 (<u>γ-myb</u>)	●		
RREB-1			● (18)
p65			● (13)
NRF2			● (9.3)
PPAR Gamma			● (20)
T3R <u>alpha</u>			● (15)



Fig.9. Alineación en el programa Ensembl de la región diferencial y los nucleótidos conservados a los que se estarían uniendo los factores transcripcionales.

A partir de los análisis *in silico* anteriores, se seleccionaron los factores AP2 alfa y AML1, debido a su alto score, a lo conservado de sus secuencias blanco, a que AML1 coincidía en dos de los tres programas, y adicionalmente a su relación directa con procesos apoptóticos y cáncer. (Anexo 1). Para determinar el posible papel que tienen en la regulación de la actividad transcripcional de Smac/DIABLO, se llevaron a cabo ensayos de mutagénesis dirigida en los sitios de unión específica de estos factores, con la ayuda del kit mutagénesis Lightning de Stratagene.

Se seleccionaron las dos G intermedias del factor AP2 α , dado que según el programa TESS todos los nucleótidos presentaban la misma probabilidad de unión para este factor y para asegurar el efecto de las mutaciones se seleccionaron los nucleótidos centrales, mientras que para el factor AML1 se seleccionaron los nucleótidos GT que eran los que tenían la mayor probabilidad de unión. Lo anterior para evitar la unión entre el factor y el DNA y así poder observar claramente el efecto de la mutación en la variación de la actividad transcripcional a través de los ensayos de gen reportero. El resultado esperado inicialmente era un aumento en la actividad transcripcional debido a que los factores transcripcionales putativos no se unirían a la región de unión del DNA del promotor de Smac/DIABLO y por lo tanto, no llevarían a cabo su función represora.

3. Identificación del silenciador transcripcional que actúa en la región promotora de Smac/DIABLO.

Para el empleo del kit se diseñaron oligos específicos que contienen dos nucleótidos mutados; para el sitio de unión tanto para AP2 alfa, como para AML1, lo que permitió modificar el sitio de unión a cada factor respectivamente. El programa TESS desplegó adicionalmente los nucleótidos en la secuencia de DNA que presentaban mayor afinidad por los factores transcripcionales de interés, razón por la que se mutaron dos de ellos. En la **Fig. 10** se aprecian los nucleótidos seleccionados, a partir de los resultados desplegados por el software TESS.

Factor	AP2alfa	AML1
Secuencia	TGGGGG	TGTGGG
Score por nucleótido	T G G G G	T G G G T G G G G T
Mutado	TG CC GG	TG CC GG

TAA	STOP
CAA	GAL

Fig.10. Secuencias consenso y mutadas para los factores AP2 α y AML1. Se incluye así mismo la secuencia control del experimento de mutagénesis que codifica para la galactosidasa una vez que es restaurado el sitio codificante. A mayor tamaño de letra, mayor probabilidad de unión de los factores a la región del DNA. En rojo se muestran los nucleótidos mutados.

El kit de mutagénesis Lightning emplea un plásmido control, denominado pWhiteScript4.5Kb, el cual contiene una mutación en un triplete que codifica para glutamato del gen de la β -galactosidasa. La mutación codifica para un codón de paro que inhibe la producción de β -galactosidasa. De igual forma el kit utiliza dos oligos complementarios que contienen una mutación que restablece el sitio que codifica para β -galactosidasa permitiendo así la producción de la enzima. Una vez que las bacterias fueron transformadas e incorporaron a su maquinaria transcripcional dicho plásmido, la coloración azul fue visible al sembrarse en placas con medio LB / IPTG/ X-Gal. Esto permitió comprobar la eficiencia del kit (**Fig. 11**).

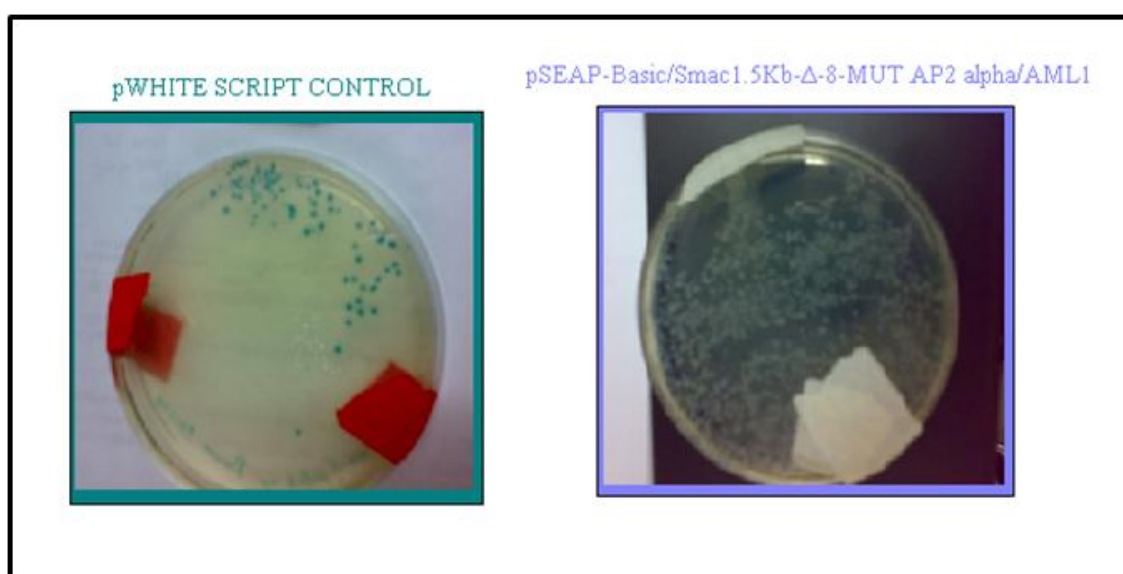


Fig. 11 Placa control y placa con plásmido mutado a partir del kit de mutagénesis de Stratagen Lightning.

Las bacterias competentes XL10-Gold fueron transformadas con el plásmido pSEAP que contenía los nucleótidos mutados de interés, previamente descrito en la metodología. Se comprobó la eficiencia de este método a través de la detección de la coloración azul en un 96% (92 de 95 colonias) de las bacterias control transformadas, lo que indica que el sitio codificante de la lactosa fue restaurado. Por lo anterior, esperábamos que al seleccionar 10 colonias, al menos una de ellas tuviera mutados los nucleótidos del sitio de unión específico para los factores transcripcionales de interés.

Respecto a la placa que contenía las colonias mutadas; tanto de AP2 alfa como AML1, se seleccionaron 10 de estas colonias y se les extrajo el DNA por medio del kit de Miniprep (Invitrogen) para secuenciarlas y corroborar de esta forma el éxito de la mutagénesis. Una vez que se obtuvo la secuenciación se corroboró que efectivamente se contaba con los nuevos plásmidos mutados, denominados: pSEAP-Basic/Smac/DIABLO1.5Kb- Δ -8-MUT AP2 alfa, pSEAP-Basic/Smac/DIABLO1.5Kb- Δ -8-MUT AML1.

Se amplificaron los plásmidos con las respectivas mutaciones y se llevaron a cabo los ensayos de gen reportero para cada factor. En cada ensayo, se cotransfectaron células HeLa con la construcciones que contenían los sitios de interés intactos y mutados, así como con el plásmido B-Gal control como control de transfección. Los resultados se graficaron y se muestran en la **Fig. 12**. La diferencia en la actividad transcripcional no fue significativa entre el vector que contenía intacto el sitio de unión (delección 8) y aquél que presentaba la mutación para los factores AP2 alfa o AML1. Se empleó el estadístico U de Mann-Whitney-Wilcoxon con una $p=0.75$ y $.7$ respectivamente con un IC de 95%.

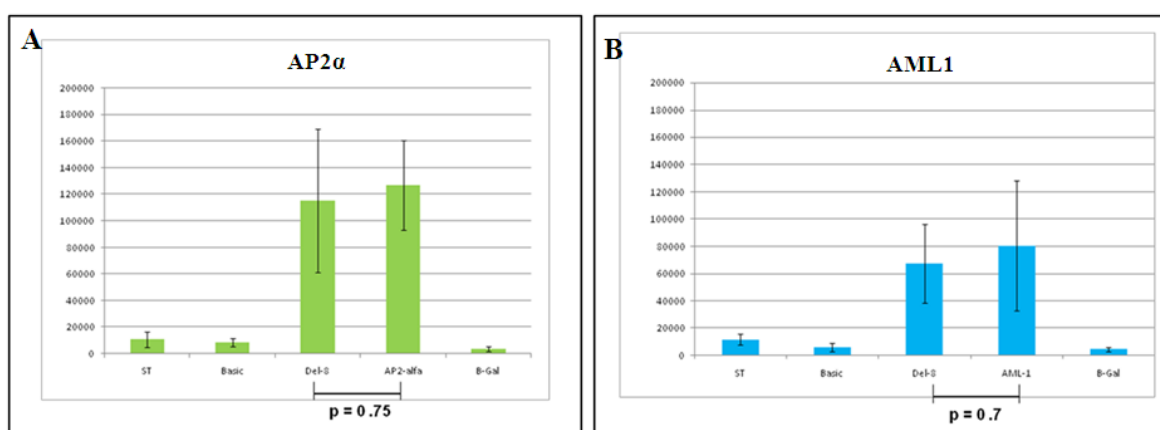


Fig. 12 Variación en la actividad transcripcional de células HeLa cotransfectadas con diversos plásmidos: Ensayo A. ST (sin transfectar), Basic (pSEAP-Basic), Del 8 (pSEAP-Basic/1.5KbSmac/DIABLO/- Δ -8), AP 2 alfa (pSEAP-Basic/1.5KbSmac/DIABLO/- Δ -8 / MUT AP2 alfa), B-Gal (pBgal Control). Ensayo B. ST (sin transfectar), Basic(pSEAP-Basic), Del8(pSEAP-Basic/1.5KbSmac/DIABLO/- Δ -8), AML1 (pSEAP-Basic/1.5KbSmac/DIABLO/- Δ -8 / MUT AML1), B-Gal (pBgal Control). Los resultados son de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. Se muestra el Error estándar (SE).

Al observar las gráficas obtenidas de la cotransfección se puede apreciar de forma clara lo que desde un principio era evidente, que las células sin trasfectar y aquellas trasfectadas con el vector vacío presentaran los niveles transcripcionales basales, mientras que aquellas células trasfectadas con el plásmido pSEAP-Basic/1.5KbSmac/DIABLO/- Δ -8 o los plásmidos que contenían las mutaciones la actividad transcripcional se vio incrementada en 6 y 4 veces respectivamente para AP2 α y AML1. A pesar de que las graficas se muestran diferentes entre sí, al considerar las barras de error estándar (SE), se puede dilucidar una variación casi nula entre las células que contienen al plásmido pSEAP-Basic/1.5KbSmac/DIABLO/- Δ -8 y las células que tienen mutado a AP2 α y AML1. Por último, se demostró que el empleo de un vector control de la transfección, en este caso p β Gal control, no afectó el experimento, puesto que la actividad transcripcional generada por este vector por si solo, fue de igual forma muy baja. De igual forma se concluyó que el vector pBgal- control demostró ser un buen control en su método de detección dado que este fue totalmente cuantitativo, a través de la quimioluminiscencia emitida por el vector y medida con el sistema multidetector Elisa.

Con estos ensayos se demostró que los factores AP2 α y AML 1 no desempeñan un papel significativo en la regulación transcripcional de Smac/ DIABLO.

3.1 Análisis de la regulación transcripcional del promotor de Smac/DIABLO por NF- κ B.

3.1.1 Determinación de los niveles de expresión de Smac/DIABLO en líneas celulares con la vía NF- κ B alterada.

En nuestro grupo de trabajo se contaba con el antecedente de que el factor transcripcional NF- κ B regulaba la expresión de Smac/DIABLO. Para determinar de qué forma, así como la región específica responsable de la regulación de su expresión, se midieron de forma semicuantitativa los niveles de Smac/ DIABLO en diferentes líneas celulares estables. Se sembraron células MDA-MB 231, MDA- MB 231- S32, CaLo y CaLo IKK que presentaban la vía de NF- κ B alterada. El primer par tenía mutado IKK en el sitio serina 32, donde se lleva a cabo la fosforilación para su posterior ubiquitinación, por lo que la vía de NF- κ B se encuentra inactivada. El segundo par por su parte sobreexpresaba IKK, por lo que había una mayor liberación y actividad de NF- κ B. Se midieron los niveles de ARN mensajero de Smac/ DIABLO por medio de PCR semi-cuantitativo para determinar si éste, era regulado de alguna forma por el factor NF- κ B (**Fig. 13**).

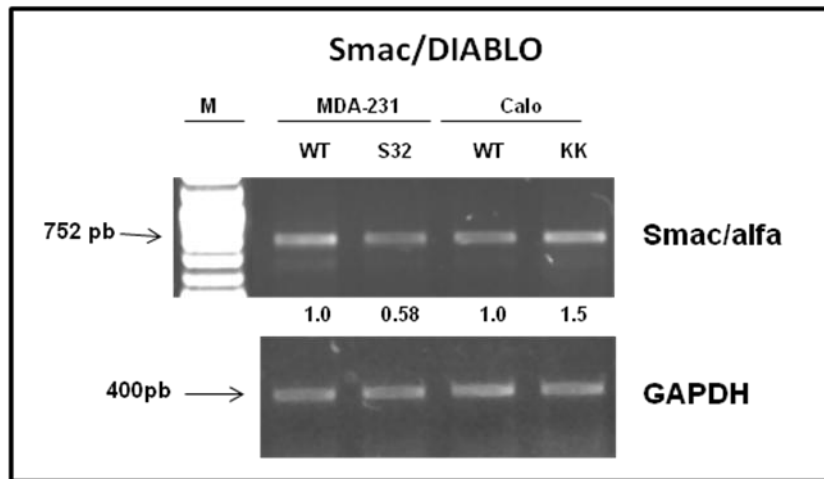


Fig.13. PCR para Smac/ DIABLO alfa en líneas celulares MDA-MB 231 (WT), MDA- MB 321 S32, CaLo (WT) y CaLo IKK, con vía de NF-κB alterada. Como control de carga se empleó la expresión de GAPDH. Adicionalmente se muestran los valores obtenidos del análisis de la densitometría en la parte inferior del gel.

A partir del gel y el análisis de densitometría, se puede concluir que; cuando se disminuye la actividad de NFκB, los niveles de RNAm de Smac/DIABLO también disminuyen. De la misma forma, cuando se incrementan la actividad de NF-κB, también lo hacen los niveles de Smac/DIABLO. Estos resultados sugieren que NF-κB regularía de forma positiva al mensajero de Smac/DIABLO.

3.1.2 Ensayos *in silico* del factor NF-κB.

En virtud de los resultados obtenidos, se realizó una búsqueda *in silico* en el software TESS, de posibles sitios de unión a NF-κB que estuvieran presentes en el promotor de Smac/ DIABLO. El programa arrojó un sitio putativo a -331 pb del sitio de inicio de la transcripción. Por último se realizó la alineación de la región que contenía el sitio putativo con ayuda de la herramienta *Ensembl*, en donde se observó que esta región se encontraba conservada en diversas especies de mamíferos como podemos observar en la **Fig. 14**.



Fig. 14 A. Región en detalle de la alineación del promotor de Smac/ DIABLO, donde se observa con claridad la región conservada donde se encuentra el sitio de unión para NF-κB , el índice GERP es cercano al valor 3.09 B. Alineación en 9 especies de mamíferos de la región promotora de Smac/DIABLO que contienen la secuencia de unión para el factor NFKB, presentado en amarillo, el sitio se encuentra en una región ampliamente conservada.

La herramienta *Ensembl*, utiliza como parámetro de referencia el valor GERP (del inglés, Genomic Evolutionary Rate Profile); para determinar que tan conservada se encuentra una región. Dicho parámetro se basa en la tasa de variación que presenta cada nucleótido a lo largo de la escala evolutiva. Un valor negativo nos indica que el nucleótido ha variado mucho respecto al ancestro en común, mientras que uno positivo nos habla de poca variación. El *score de GERP* que se obtuvo fue de 2.54.

3.2 Amplificación de la región promotora de Smac / DIABLO.

Para poder estudiar el sitio putativo de unión a NF- κ B se realizó una PCR anidada, para re-amplificar la región promotora de Smac/DIABLO de 1.5 Kb; ésto debido a que las construcciones 8 y 10 con las que se contaba, realizadas con anterioridad por Martínez y *col.*, 2007 presentaban una región ausente de 169 pb respecto a lo reportado en el NCBI, donde se propone reside el sitio de unión para NF- κ B. Para corroborar que esta delección se presentaba como un caso individual únicamente y no se daba en forma homóloga en todos los promotores de Smac/DIABLO se extrajo DNA genómico de sangre periférica y de la línea celular HEK293 (células epiteliales de riñón embrionario). La región fue re-amplificada y visualizada en un gel de agarosa al 1.5 mostrado en la **Fig. 15**.



Fig. 15. PCR para la región de 1.5 Kb del promotor de Smac/ DIABLO en la línea celular HEK293 y DNA genómico.

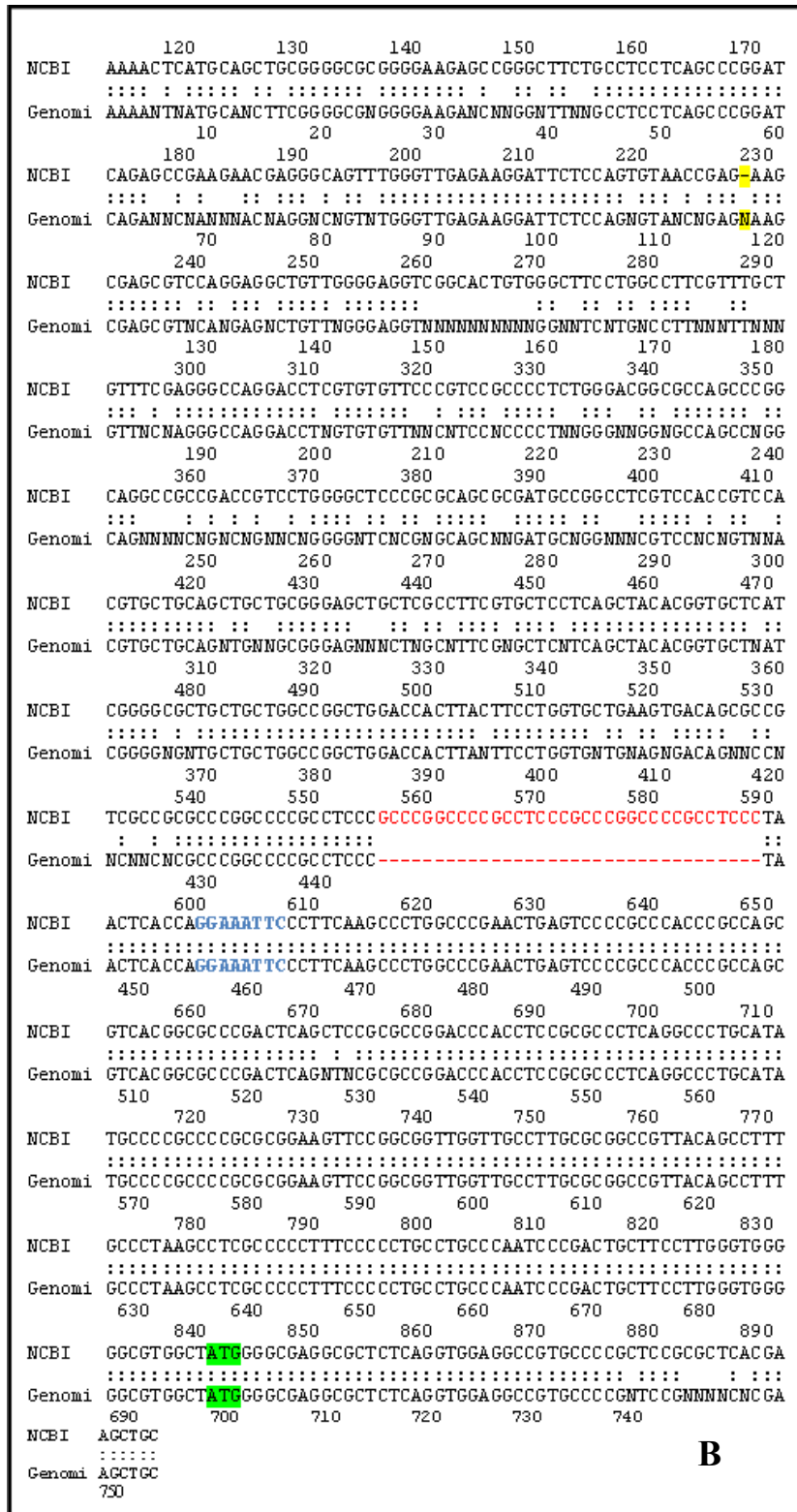
En ambos casos, la secuencia coincidió con la reportada por el NCBI, con excepción de una región deletada de 34 pb. Sin embargo, el sitio de unión a NF- κ B si está presente (**Fig.16**). Tanto la secuenciación correspondiente a la región del promotor de Smac/DIABLO en la línea celular HEK293, como la de DNA obtenido de sangre periférica fueron exitosos; obteniéndose en este último una mayor pureza. Por lo que se decidió trabajar con ella.

```

      10      20      30      40      50      60
NCBI  GGCTGCAGCTTGAGTGACGGGAAAAGAAAGGTTTACTCCACCAGCGCATTAGCGGCACCTC
      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HEK293 GGNMNCAGNT-GAGTGMNNGGGAANANNAAGGTTTANTMCACCNGCGCATTAGCGGCACMN
      40      50      60      70      80
      70      80      90      100     110     120
NCBI  ACAGCATTAAAAATGCAGGAGGTGGTGGGAGGAGCGGGCCAGGGAGGAAAACCTCATGCAG
      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HEK293 NN-GCATNAAAAAN-GCAGGAGMTGGTGGGAGNAGCNGNCAGGGAGGAAAACCTCATGCAG
      90     100     110     120     130     140
      130     140     150     160     170     180
NCBI  CTGCGGGGCGCGGGGAAGA GCCGGGCTTCTGCCTCCTCAGCCCGGATCAGAGCCGAAGAA
      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HEK293 NTGCGGGGCGCGGGGAAGA GCCGGGCMNNTGCCTCNTCAGCCCGGNTCAGAGCCNAAGAA
      150     160     170     180     190     200
      190     200     210     220     230     240
NCBI  CGAGGGCAGTTTGGGTTGAGAAGGATTCTCCAGTGTAACCGAGAAGCGAGCGTCCAGGAG
      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HEK293 CGANGGCAGTNTGGGTTGAGAAGGATTCTCCAGNGTAACCGAGAAGCGAGCGTCCANGAG
      210     220     230     240     250     260
      250     260     270     280     290     300
NCBI  GCTGTGGGGAGGTGGCACTGTGGGCTTCTGGCCCTTCGTTTGTGTTTCGAGGGCCAG
      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HEK293 GCTGTGGGGAGGTNGGCACTGTGGGCTTCTGGCCCTTNGTTTGTGTTTCGAGGGCCAG
      270     280     290     300     310     320
      310     320     330     340     350     360
NCBI  GACCTCGTGTGTTCCGTC CGCCCTCTGCGGACGGCCAGCCCGCAGGCCCGCCGACCG
      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HEK293 GACCTCGTGTGTTCCGTC CGCCCTCTGCGGANGGNGCCAGCCCGCAGGCCCGCCGACCG
      330     340     350     360     370     380
      370     380     390     400     410     420
NCBI  TCCTGGGGCTCCCGCGCAGCGGATGCCGGCCTCGTCCACCGTCCACGTGCTGCAGCTGC
      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HEK293 TCCTGGGGNTCCCGCGCAGCGGATGCCGGCNTCGTCCACCGTCCACGTGCTGCAGCTGC
      390     400     410     420     430     440
      430     440     450     460     470     480
NCBI  TGGGGGAGCTGCTCGCCTTCTGCTCCTCAGCTACACGGTGTCTATCGGGGGCGCTGTGTC
      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HEK293 TGGGGGAGCTGCTCGCCTTCTGCTCCTCAGCTACACGGTGTCTATCGGGGGCGCTGTGTC
      450     460     470     480     490     500
      490     500     510     520     530     540
NCBI  TGGCCGGCTGGACCACTTACTTCTGGTGCTGAAAGTGACAGCGCCGTCGCGCCGCCCCGGC
      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HEK293 TGGCCGGCTGGACCACTTACTTCTGGTGCTGAAAGTGACAGMNC GNGCGCCGCCCCGGC
      510     520     530     540     550     560
      550     560     570     580     590     600
NCBI  CCCGCCTCCC GCGCGCCCGCCTCCCGC CCGGC CCGGC CTCCTAACTCACCAGGAAAT
      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HEK293 CCCGCCTCCC -----TAACTCACCAGGAAAT
      570     580     590
      610     620     630     640     650     660
NCBI  TCCCTTCAAGCCCTGGCCC GAACTGAGTCCCGCCACC CGCCAGCGTACGGCGCCCGA
      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HEK293 TCCCTTCAAGCCCTGGCCC GAACTGAGTCCCGCCACC CGCCAGCGTACGGCGCCCGA
      600     610     620     630     640     650
      670     680     690     700     710     720
NCBI  CTCAGTCCCGCGCCGGACC CACCTCCGCGCCCTCAGGCC CTGCATATGCCCGCC CCGCGG
      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HEK293 CTCANNTNCGCGCCGGACC CACCTCCGCGCCCTCAGNCC CTGCATANGCC CCGCC CCGCGG
      660     670     680     690     700     710
      730     740     750     760     770     780
NCBI  CGGAA GTTCCGGCGTTGGTTGCC TTGCGCGGCC GTTACAGCCTTTGCC CTAAGCCTCGC
      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HEK293 CGGAA GTTCCGGCGTTGGTTGCC TTGCGCGGCC GTTACAGCCTTTGCC CTAAGCCTCGC
      720     730     740     750     760     770
      790     800     810     820     830     840
NCBI  CCCCTTTCCCCTGCTGC CCAATCCC GACTGCTTCCTTGGGTGGGGGCGTG GCTATGGG
      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HEK293 CCCCTTTCCCCTGCTGC CCAATCCC GACTGCTTCCTTGGGTGGGGGCGTG GCTATGGG
      780     790     800     810     820     830
      850     860     870     880     890
NCBI  GCGAGGCGCTCTCAGGTGGAGGCC GTGCC CCGCTCCGCGCTCAC GAAGCTGC
      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HEK293 GCGAGGCGCTCTCAGGTGGAGGCC GTGCC CCGCTCCGCGCTCAC GAAGCTGC
      840     850     860     870     880

```

A



B

Fig.16 Comparación de la región de 1.5 kb de la secuencia promotora de Smac/DIABLO. Ésta fue obtenida a partir del NCBI y comparada contra la secuenciación del DNA de línea celular HEK293 (A) y del DNA de sangre periférica (B). En rojo se muestra la región ausente, en azul el sitio putativo de unión para NF- κ B, en verde el sitio de inicio de la traducción y en amarillo la única delección encontrada en las dos comparaciones.

3.3 Clonación del promotor de 1.5 Kb de Smac/ DIABLO en el vector pTZ57R/T.

El siguiente paso fue la clonación del promotor de 1.5 Kb en un plásmido reportero (pSEAP), a lo cual le antecedió una subclonación en el vector pTZ57R/T con la finalidad de enriquecer la cantidad de inserto con la que se contaba para este procedimiento. Este último vector se caracteriza por presentar extremos dTT que facilitan la ligación del inserto obtenido del PCR con cola de poliA, que es agregada naturalmente durante el ciclo de extensión por las enzimas DNA polimerasas que añaden adeninas en los extremos del producto de PCR, tales como la polimerasa Taq que fue empleada.

Se clonó de forma exitosa el promotor de Smac/DIABLO 1.5 kB en el vector pTZ57R/T (*InsTAclone*). Posterior a la clonación del fragmento y a la transformación bacteriana, se eligieron 3 colonias para identificar la presencia del inserto de interés, así como la banda correspondiente a 2.8 Kb del vector pTZ57R/T, comprobando de esta manera, el éxito en la clonación del promotor de Smac/DIABLO en el vector pTZ57R/T (**Fig. 17**).



Fig. 17. Digestión del vector pTZ57R-T/ 1.5 Kb Smac/DIABLO con enzimas específicas.

3.4. Clonación del promotor de 1.5 Kb de Smac / DIABLO en el vector pSEAP-Basic.

Se realizó el MIDIPREP de la colonia 4, que si contenía el fragmento de interés. Digerí con Eco y Xho y purifiqué mi fragmento de interés (1.5 Kb del promotor). De igual forma linearicé mi vector pSEAP- Basic, con las enzimas antes mencionadas para poder llevar a cabo la ligación y posteriormente la transformación de bacterias DH5 alfa. Para dicha transformación se trabajó con una relación 3:1 inserto/ vector.

Se analizaron 6 diferentes colonias de mi medio placa IPTG/ X-Gal con las bacterias transformadas por digestión diferencial., en esta ocasión la colonia 1 fue la que liberó las bandas esperadas (**Fig. 18**). Se corroboró por secuenciación la identidad del fragmento de 1.5 Kb (que contiene el sitio de unión a NF-κB) dentro del vector pSEAP y la ausencia de mutaciones.

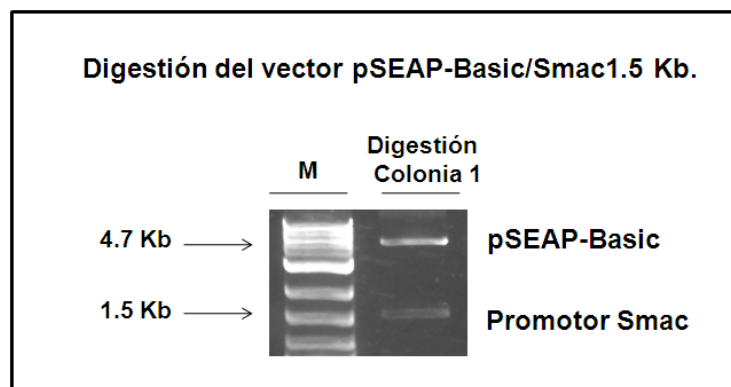


Fig. 18 Digestión del vector pSEAP-Basic/Smac/DIABLO 1.5 Kb con las enzimas de restricción EcoRI y XhoI.

Para evaluar si la región de NF- κ B al promotor de Smac/DIABLO regula la transcripción, se propuso un experimento mediante el cual se midiera la variación en la actividad transcripcional del promotor de Smac/DIABLO en células transfectadas con el vector pSEAP-Basic/Smac/DIABLO 1.5 Kb que contenía el sitio de unión para el factor NF- κ B. No obstante, para cumplir el objetivo anterior, la vía NF- κ B tenía que estar activa. En diversos artículos se ha demostrado que el TNF- α activa la vía NF- κ B y permite que este factor interactúe con la región promotora de genes blanco. Motivo por el cual, se verificó que el TNF- α verdaderamente activara NF- κ B a una concentración de 25ng/ml., con la cual se había trabajado previamente en el laboratorio. Para ello, se estimularon células HeLa transfectadas de forma estable (HeLa NF- κ B new) con el vector pHTS- NF- κ B (*Biomyx*); el cual contiene 5 sitios de unión para NF- κ B río arriba del gen luciferasa (Luc), que funciona como gen reportero, pues emite luminiscencia al activarse la transcripción de éste dada por la estimulación de los sitios de unión a NF- κ B. Para medir la luminiscencia se empleó el kit de Dual Luciferase Reporter Assay System (*Promega*), los valores obtenidos fueron normalizados respecto a la cantidad total de proteína. El estímulo se aplicó por 6 hrs. Asimismo, el experimento fue realizado por triplicado. Se comprobó que efectivamente, el factor TNF- α estimulaba la vía de NF- κ B e incrementaba su actividad casi al doble, como puede observarse en la **Fig.19**.

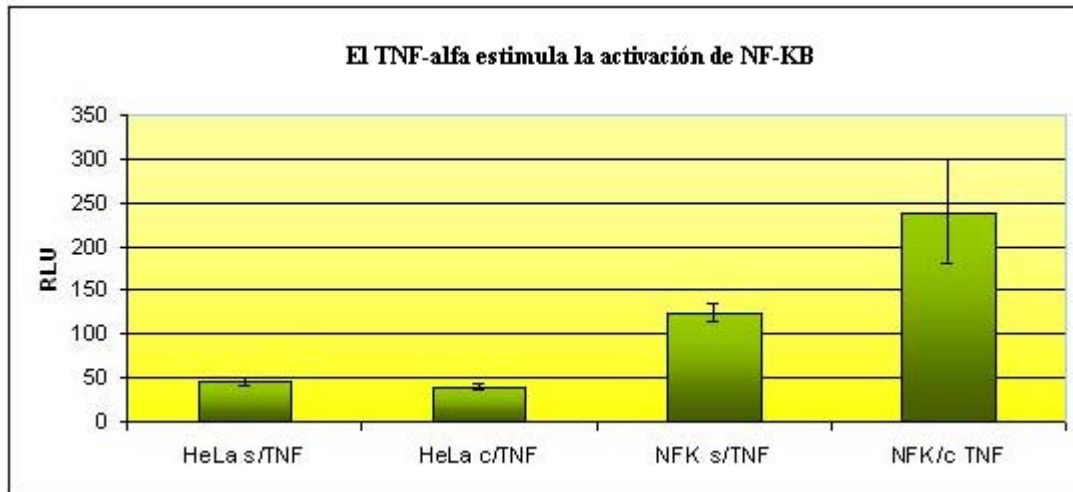


Fig. 19 TNF-alfa activa la vía de NF- κ B. Después de 6 horas de aplicar el estímulo a una concentración de 25 ng./ml a las células que contenían el vector pHTS, se cuantificó la luminiscencia presente una vez activada la transcripción. Las primeras dos columnas corresponden a los controles; en la primera de éstas, se observan los niveles basales de actividad transcripcional que presentan las células HeLa cuando no son estimuladas, mientras que en la segunda columna se les aplica el estímulo de TNF a las mismas células sin observar un cambio significativo respecto a las que no recibieron tratamiento. Por su parte, el incremento de la actividad transcripcional es notable en las últimas dos columnas respecto a las dos primeras. La última columna representa a las células HeLa NFKB new estimuladas con el TNF-alfa, en donde la actividad transcripcional se incrementa al doble, respecto a las que no fueron estimuladas.

Gracias a que se cuenta con la construcción del promotor pSEAP-Basic 1.5 Kb, que contiene a la región promotora de Smac/DIABLO donde se encuentra el sitio de unión putativo para NF- κ B y con base en los resultados obtenidos de este último experimento; en el que se demostró *in vitro* la activación de este factor, así como lo observado previamente en los resultados de la variación de la actividad transcripcional del promotor de Smac/ DIABLO dada por diferentes factores transcripcionales, se podrían realizar variados experimentos que permitan identificar la participación del factor NF- κ B en la regulación del mensajero de Smac/DIABLO.

X. DISCUSIÓN.

Actualmente se sabe que el cáncer es la tercera causa de muerte en el país, con una tasa de mortalidad del 12.7%, siendo la resistencia al tratamiento una de las grandes barreras a superar dado al origen multifactorial de dicha enfermedad. Por tal motivo los esfuerzos en investigación a nivel mundial se han enfocado a estudiar y dilucidar cuales son las principales alteraciones moleculares y celulares que se presentan durante el desarrollo de la enfermedad. De las distintas características que determinan el desarrollo del cáncer, la evasión de la apoptosis y la desregulación de la proliferación son esenciales en el desarrollo tumoral y por ende las más estudiadas. Los defectos en las vías de señalización de la apoptosis dan como resultado la resistencia a los anti-neoplásicos por parte de las células tumorales, de ahí que uno de los principales objetivos de los tratamientos oncológicos sea erradicar la resistencia de las células tumorales a estos fármacos. Por eso uno de los mayores retos de la oncología es traducir el conocimiento sobre las vías de señalización de apoptosis hacia aplicaciones clínicas. La apoptosis es el resultado de la activación de una de las dos vías principales, la extrínseca/o de receptores de muerte o la intrínseca o mitocondrial, que como su nombre lo indica su activación está dada por la liberación de moléculas desde el interior del espacio intermembranal de la mitocondria hacia el citosol, que al interactuar con las caspasas llevan a cabo el proceso de la apoptosis.

Smac/DIABLO es un miembro esencial de la vía intrínseca en donde ejerce una función pro-apoptótica al inhibir la acción de las IAPs, restaurando de esta forma la apoptosis. Diversos estudios han mostrado la variación de la expresión de Smac/DIABLO tanto a nivel de proteína como de RNAm en el cáncer, sin embargo son pocos los reportes en donde se ha podido establecer una correlación directa de éstos cambios con los diferentes tipos de cáncer; obstaculizando así el empleo más amplio de Smac /DIABLO como un marcador para el pronóstico y/o diagnóstico de la enfermedad. En nuestro grupo de trabajo se demostró que la expresión de la proteína de Smac/DIABLO correlacionó positivamente con la densidad microvascular en pacientes con carcinoma de células escamosas del cuello uterino. Por otro lado Kempkensteffen C. y su grupo de trabajo mostraron que los niveles de RNAm de Smac / DIABLO disminuían en tumores germinales no seminomatosos. Otro ejemplo reciente correspondiente al grupo de Shibata demostró que los pacientes con adenocarcinomas gástricos presentaban mayor expresión de RNAm de Smac/DIABLO. A pesar del auge en la investigación de la proteína Smac/DIABLO en los últimos años, poco se conoce acerca de sus mecanismos de regulación transcripcional. A la fecha solo se conocen poco reguladores transcripcionales de este gen, los cuales son el ácido fólico, el factor de necrosis tumoral, el IFN- γ ; incrementando los niveles de RNAm, y E2F1, Par-4 y cAMP regulando positivamente la expresión del gen de interés.

Los resultados obtenidos en nuestro grupo de trabajo donde se concluyó que la apoptosis inducida por AMPc requiere de la sobrerregulación transcripcional de Smac/DIABLO sentaron las bases para el desarrollo de esta tesis. En el trabajo realizado por Martínez y col. 2007, se mostro que al llevar acabo delecciones subsecuentes del promotor, la actividad transcripcional permanecía invariable, sin embargo en la transición de la construcción 9 a la construcción 10, los niveles transcripcionales se incrementaban de forma considerable, por lo que se propuso la existencia de algún factor regulador en dicha región (la región -625/-726).

Inicialmente se determinó la identidad de las construcciones que contenían las secuencias de interés, las construcciones 9 y 10. Los resultados arrojaron que la construcción 9 presentaba una recombinación incorrecta, por lo que se decidió trabajar en la construcción anterior, la número 8 y la 10. No obstante lo anterior no afecto en el proyecto ya que la construcción 8 incluía a la 9, así como la región promotora de interés. Se decidió buscar a través de softwares bioinformáticos los factores que estuvieran implicados en la regulación transcripcional de esta región del promotor. Se trabajó con los programas ChipMapper, Genomatix y TESS; dentro de éstos, una ventaja importante que ofrece el software de TESS es la posibilidad de visualizar claramente las regiones del DNA a las cuales se unen los diversos factores transcripcionales putativos, así como la probabilidad de unión específica por cada nucleótido. Los “scores” más altos de cada factor arrojado en cada programa bioinformático fue otra de las características tomadas en cuenta para determinar la probabilidad de unión de estos al promotor. Adicionalmente, la región diferencial entre la construcción 8 y 10 (102 pb) fue analizada *in silico* cumpliendo así el segundo objetivo, donde se empleó la herramienta *Ensemble* de Pubmed para llevar a cabo la alineación en 5 especies de mamíferos, esta búsqueda nos arrojó dos regiones conservadas pequeñas, las cuales fueron empalmadas con las secuencias putativas de unión para los factores transcripcionales mostrados en la tabla 1, esto nos permitió refinar más nuestra búsqueda, pues se consideraron a aquellos factores que se unían a las regiones más conservadas de nuestra región diferencial del promotor y presentaban “scores” altos. Finalmente se compararon los resultados obtenidos por los tres programas, seleccionando los factores comunes entre ellos, incluyendo su relevancia en artículos relacionados al cáncer y la apoptosis.

En virtud de las consideraciones anteriores, los factores transcripcionales seleccionados a estudiar fueron AP2 α y AML1. Se apostó al factor AP2 α ya que podría estar implicado en la regulación de Smac/DIABLO pues se ha demostrado su relación en los procesos de desarrollo, diferenciación celular (89), así como en el desarrollo de ciertas enfermedades humanas, como por ejemplo en cáncer de mama en donde se encuentra relacionado con HER2, el cual está altamente asociado con el mal pronóstico (85, 90 y 91). Algunas otras evidencias que nos permitieron considerar a AP2 α como posible candidato regulador de la actividad transcripcional de Smac/DIABLO, fueron los

resultados obtenidos por el grupo de trabajo de Wajapeyee donde se demostró que al transfectar la línea celular SW480 para que sobreexpresara AP-2 α , los niveles de disrupción de potencial de membrana externo de la mitocondria se veían decrementados 2.5 veces, lo que conllevaba al aumento en la liberación de moléculas propias de la mitocondria como citocromo c y Smac/DIABLO, así como la traslocación de la proteína Bax a la mitocondria; comprobando de esta forma que la vía mitocondrial era la principal ruta por la que se activaba la apoptosis (96).

Por su parte AML1, fue seleccionado tanto por sus altas probabilidades de unión a la región conservada del promotor de Smac/DIABLO (*in silico*), como por su participación en procesos de diferenciación, apoptosis y autoregeneración de células hematopoyéticas (98). Además los miembros de la familia RUNX, a la que pertenece este factor, actúan como factores organizadores de los promotores y enhancers de genes blancos, donde se asocian con otros factores de transcripción, necesarios para la regulación génica. Así mismo, las proteínas de esta familia son potentes represores de la transcripción aun cuando se expresan solos, lo que sugiere que una de sus funciones pueden ser la represión transcripcional (97).

Para cubrir el tercer objetivo planteado en este proyecto se procedió a identificar al posible factor transcripcional que estaría regulando al promotor de Smac/DIABLO *in vitro*, para ello se realizaron ensayos de mutagénesis, seguidos por ensayos del gen reportero; tanto para el factor AP2 α como para AML1. Hasta el momento se han reportado diferentes secuencias consenso de unión para los factores antes mencionados; en el caso de AP2 α en el artículo de Begeer, 2001 se propuso el sitio de unión consenso GCCNNNGGC, así como el sitio GCCCCCCGC en el artículo de Aas, 2009; mientras que para AML1 se describió el sitio GTGGNNG por el autor Durst, 2004; no obstante el programa de TESS arroja la secuencia consenso TGGGGA, para el caso de AP2 α y TGTGGG para AML1. Como ya se mencionó el programa tiene muchas ventajas, una más de ellas es la de identificar por cada secuencia consenso la probabilidad de unión por nucleótido a la región de DNA específica.

Para medir el cambio en la actividad transcripcional, se procedió a co-transfectar la línea celular HeLa con el plásmido pSEAP- Basic/ Δ 8 que contenía los nucleótidos mutados en el sitio de unión de los factores transcripcionales (un plásmido para AP2 α y otro para AML1) y el plásmido pBgal Control. Como un control de la transfección adicional, se extrajo y cuantifico la proteína total por pozo. El experimento del gen reportero para las mutaciones de ambos factores transcripcionales, fue realizado por triplicado en tres experimentos independientes y normalizado como ya se menciona en la metodología. Así mismo se grafico el promedio de estos resultados con su error estándar empleando el estadístico de U de Mann-Whitney-Wilcoxon obteniendo para el factor AP2 α una $p = 0.75$ y para AML1 una $p = 0.70$ con un intervalo de confianza del 95%. A simple

vista podemos observar que el resultado no fue significativo, lo que nos permite concluir que probablemente los factores transcripcionales AP2 α y AML1 no jueguen un papel determinante en la regulación transcripcional del promotor de Smac/DIABLO, sin embargo, si se observó un ligero incremento en la actividad transcripcional para cada uno de los experimentos que contaban con las mutaciones de interés, respecto a las células que únicamente tenían el plásmido pSEAP- Δ 8, esto indica que el resultado presentó una tendencia al resultado esperado inicialmente; se podrían realizar experimentos alternos, para desechar por completo la hipótesis planteada.

Respecto a la participación de NF- κ B como regulador transcripcional se ha encontrado que sobre regula ciertos genes relacionadas tanto a la respuesta pro-apoptótica como a la anti-apoptótica. La habilidad de NF- κ B para suprimir la apoptosis y regular la transición del ciclo celular claramente indica que este puede participar en diversos aspectos de la oncogénesis. De hecho, la elevación de la actividad de NF- κ B es evidente en diversos cánceres humanos. Gracias a estas evidencias y al trabajo que se ha realizado previamente en el laboratorio, se cultivaron líneas celulares estables que contaban con la vía de NF- κ B alterada (MDA-MB231S32 y CaLo IKK), a las cuales se les extrajo y midió de forma semicuantitativa los niveles de RNAm de Smac/DIABLO. Los resultados obtenidos mostraron una primera aproximación a la hipótesis previamente planteada, dado que los niveles de RNAm de Smac/DIABLO correlacionaron de forma positiva con los niveles de actividad de NF- κ B en cada una de las líneas celulares. Los resultados anteriores corroboraron la relación de NF- κ B con Smac/DIABLO, por ello se prosiguió con la búsqueda de un sitio de unión a NF- κ B en el promotor de Smac/DIABLO, que pudiera estar regulando esta interacción.

En virtud del escenario planteado, se investigó con la ayuda de herramientas bioinformáticas; como *Ensembl* y *TESS*, si este factor podría regular la actividad transcripcional del promotor de Smac/DIABLO. Al analizar la región promotora de 1.5 Kb de Smac/DIABLO en el software *TESS*, se vislumbró la presencia de un sitio de unión de NF- κ B en dicha región, la cual al ser alineada en 31 especies de mamíferos demostró estar muy conservada; convirtiéndose así en un sitio atractivo a estudiar. A lo largo de la secuencia promotora de 1.5 Kb se observaron diversas zonas conservadas caracterizadas por presentar un índice GERP (*del inglés Genomics Evolutionary Rate Profile*) relativamente alto (2.54) confirmándonos así la importancia de dichas regiones, ya que evolutivamente hablando esto nos indica que a pesar de las fuerzas evolutivas a las cuales han estado sometidas las especies que se emplearon para la alineación, la presencia de estos sitios se ha conservado, proponiendo así una función específica para estos. Una de estas funciones podría estar relacionada con la regulación transcripcional del promotor de Smac/DIABLO, a través de factores transcripcionales que se unen específicamente.

Desafortunadamente, al mapear este sitio en las secuencias promotoras con las que se había estado trabajando, se evidenció la ausencia de este. En el artículo referenciado de Martínez y *col.* 2007 se menciona la ausencia de una región de 169 pb respecto a la secuencia reportada en el NCBI. Al estudiar detalladamente este artículo, se supo que dicha diferencia estuvo directamente relacionada a la muestra de sangre periférica empleada. En estas condiciones, se decidió corroborar si realmente esta delección se encontraba presente en cualquier DNA genómico de eucariontes. Por ello se trabajó con muestras propias de DNA extraído de sangre periférica y otro de línea celular (HEK293). Posterior a la amplificación de las regiones promotoras de 1.5 Kb de ambas muestras se obtuvo la secuencia de nucleótidos por medio de secuenciación. Éstas, fueron comparadas respecto a las reportadas por el NCBI, encontrándose un porcentaje de identidad cercano al 90% para ambas. No obstante, una vez más se observó una región deletada de 34 pb en la misma zona reportada en el artículo de Martínez y *col.* 2007. A pesar de esto, las dos secuencias presentaron intacto el sitio de unión a NF- κ B. En ambas secuencias tanto de la de línea celular (HEK293) como en la de sangre periférica, la distancia entre el sitio NF- κ B y la región deletada de 34pb fue de 10pb. Por su parte el resto de la secuencia en ambas amplificaciones fue muy similar a lo reportado en el NCBI, con excepción de una inserción de un nucleótido en el promotor obtenido de sangre periférica. Es interesante, el hecho de que tanto en el artículo de Martínez y *col.* 2007 como en este estudio la región promotora de Smac/DIABLO presente importantes delecciones alrededor de -200pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción. A la fecha no hay reportes de alteraciones en esta región. No obstante la página de GenCards; disponible en la red, sí menciona la presencia de al menos 15 SNPs a lo largo de la región promotora de Smac/ DIABLO. De éstos, la mayoría hace referencia a delecciones o inserciones puntuales, pero ninguno de éstos se presenta como regiones deletadas amplias, por lo que se podría profundizar más en el tema y determinar así una posible relación- función de la región deletada de aproximadamente 34 pb del promotor y los niveles de RNAm totales.

Debido a que contamos con la región promotora de 1.5 Kb del promotor de Smac/DIABLO, el cuál contenía el sitio de unión de NF- κ B se procedió a clonar este inserto en un vector reportero. Para ello, se clonó primero el inserto en un vector pTZ57R-T, posteriormente se realizó el Miniprep correspondiente y la digestión diferencial, con ello se comprobó el éxito de la clonación pues se obtuvieron las dos bandas esperadas. Después de purificar a partir del gel el fragmento de 1.5 Kb, se procedió a clonarlo en el vector reportero pSEAP- BASIC.

Dado que se llevó a cabo una exitosa clonación, comprobada por secuenciación y digestión diferencial, se nombró al nuevo vector pSEAP- Basic/ 1.5 Kb Smac/DIABLO, con el que se podrán realizar ensayos de gen reportero. En este caso será necesario activar la vía de NF- κ B y de esta forma permitir que el factor transcripcional se una al promotor de Smac/DIABLO, observando por

último la variación en la actividad transcripcional. Se sabe que el factor TNF- α puede activar a NF- κ B, por lo que se estableció un modelo en donde se pudiera corroborar lo anterior. El estímulo de 25ng./ml. fue suficiente para incrementar en 5 veces la actividad transcripcional de NF- κ B.

Recientemente, se ha observado una relación entre Smac/ DIABLO y NF- κ B; como lo demuestra el grupo de trabajo de Dai Y, y *col.*, 2009, pues a partir de sus resultados concluyen que el mimético de Smac/DIABLO (SH122) sensibiliza a las células de cáncer de próstata humano a la apoptosis inducida por TRAIL a través del bloqueo de las IAPs y la vía de NF- κ B. En otro artículo, del mismo año, se demostró que mediante TNF autocrino, un mimético de Smac/DIABLO (SM) inducía la activación de la vía de NF- κ B mediada por IKK- β que protegía originalmente a las células de la apoptosis. Este grupo propone que el bloqueo de NF- κ B podría ser una aproximación efectiva para potenciar el blanco anticancerígeno de Smac/ DIABLO. En virtud de la literatura citada, los resultados preliminares obtenidos en nuestro grupo de trabajo, así como los resultados de este proyecto se puede proponer al factor de transcripción NF- κ B como un posible candidato regulador de los niveles de ARNm de Smac/ DIABLO, dejando el camino abierto a nuevas investigaciones.

XI. PERSPECTIVAS.

Una vez clonada la región promotora de Smac/DIABLO y localizado el sitio probable de unión para NF- κ B, sería posible realizar experimentos como los llevados a cabo para los sitios de AML1 y AP2 α para de esta forma establecer una primera aproximación de la relación entre este factor transcripcional y Smac/DIABLO.

XII. CONCLUSIONES.

- Se concluyó que AP2 α , y AML1 no modulan la actividad transcripcional del promotor de Smac/DIABLO en la región propuesta.
- Se encontró evidencia que sugiere la participación del factor NF- κ B en la regulación positiva del mensajero de Smac/DIABLO.
- Se comprobó que el TNF α , a una concentración de 25 ng/ml por 6 horas en células HeLa, incrementa la actividad de NF- κ B en 5 veces.

XIII. ANEXOS.

1 Factor transcripcional AP2 α .

La familia del factor de transcripción AP2 consiste en cinco miembros, denominados AP2 α , AP2 β , AP2 γ , AP2 δ y AP2 ϵ (80, 81). Estas poseen una estructura modular con un carboxilo terminal conservado que media tanto la unión a la secuencia consenso GCCNNNGGC como la homodimerización de los factores AP2, así como un dominio amino terminal de activación transcripcional rico en prolina (80, 82, 83).

Los factores de la familia AP2 juegan un papel importante en el desarrollo y la diferenciación celular (84). Investigaciones recientes se han enfocado en las alteraciones de la actividad de AP2 y su relación con el desarrollo de enfermedades humanas. Por ejemplo, en cáncer de mama la expresión de AP2 está ligada con el incremento de la expresión de su gen blanco, c-erbB-2 (HER2) el cual está asociado con un mal pronóstico clínico (80, 85, 86). Por otro lado una pérdida de la expresión está relacionada con una regulación a la baja de c-kit y una progresión tumoral en melanoma maligno.

Diversas evidencias indican que AP-2 α puede actuar como un gen supresor de tumores. El gen de AP-2 α está localizado en el cromosoma 6 p22, una región en donde se presenta de manera frecuente la pérdida de heterocigosidad en cáncer de mama y otros tipos de cánceres (87, 88). Se ha reportado que una disminución de AP-2 α correlaciona con una transformación mediada por el oncogen Ras (89). De igual forma y en correlación a los resultados obtenidos la expresión de un alelo dominante negativo de AP-2 α resulto en el incremento de invasividad y tumorigenicidad (90).

Los resultados obtenidos en el laboratorio del grupo de Wajapeyee y colaboradores sugieren que la sobreexpresión de AP-2 α mediada por un adeno-virus inhibe el crecimiento de las células cancerosas a través de la inhibición de la síntesis del DNA celular y la inducción de la apoptosis (91). Adicionalmente, este mismo grupo demostró que AP-2 α reprime transcripcionalmente a Bcl-2 a través de la unión de su promotor tanto *in vitro* como *in vivo*.

2. Factor Transcripcional AML1.

RUNX1, también llamado AML1, es un miembro de la familia de factores transcripcionales RUNX, y es a su vez uno de los blancos más frecuentes de translocaciones en diversos tipos de leucemias. AML1 es un factor transcripcional muy importante, ya que puede incrementar o reprimir la expresión de una gran cantidad de genes relacionados con la hematopoyesis. Este gen puede presentar una serie de modificaciones postraduccionales y ver afectada su actividad, entre las que destacan la diferenciación, la apoptosis y la autoregeneración de las células hematopoyéticas (92). Reportes muy recientes revelaron que los pacientes con leucemia mieloide aguda (AML) tratados con quimioterapia presentaron altos niveles de proteína de Smac/DIABLO, en los cuales, la tasa de remisión fue alta y la supervivencia de estos más larga (93).

Cuando son colocados en el contexto adecuado los miembros de la familia RUNX, actúan como factores organizadores de los promotores y enhancers de genes blancos, donde se asocian con cofactores y otros factores de transcripción a otros factores de RNA que son necesarios para la regulación génica. Así mismo, las proteínas de esta familia son potentes represores de la transcripción aun cuando se expresan solos, lo que sugiere que una de sus funciones pueden ser la represión transcripcional (94). Los genes de la familia RUNX presentan un reto al sencillo sistema de clasificación binario de los genes implicados en cáncer ya que estos despliegan las características tanto de oncogenes como de genes supresores de tumores, en diferentes líneas y contextos celulares. Los tres genes de mamíferos de RUNX codifican factores de transcripción con distintos papeles en el desarrollo normal y los patrones de expresión tejido-específico (95).

3. Abreviaturas.

IAPs: Proteínas Inhibidoras de Apoptosis.

Smac / DIABLO: del inglés Second mitochondrial –derived activator of caspase / Direct Inhibitor of Apoptosis (IAP) - binding protein with low pI,

AML1: del inglés Acute Myeloid Leukemia 1 factor.

NF- κ B: Factor Nuclear κ B.

BIR: Repeticiones IAP Baculovirales.

aa: aminoácidos.

cAMP: AMP cíclico.

ARNm: ARN mensajero.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AIF: Apoptosis Inducing Factor.

EndoG: endonucleasa G.

OMI/ HTRA2: del inglés high temperature –requierment protein A2.

FasL: Fas ligando.

DISC: del inglés Complex signaling induction death.

XIAP: Proteína Inhibidora de Apoptosis ligada al cromosoma X.

RING: del inglés Really interesting new gene.

VDAC: del inglés Voltage Dependent Channels.

OMM: del inglés Outer Mitochondrial Membrane.

ATP: Adenosin Trifosfato.

IMM: del inglés Inner Mitochondrial Membrane.

PT: del inglés Permeable Pore.

hBMSC: células madre humanas mesenquimales de hueso.

RNAi: RNA de interferencia.

IFN γ : Interferon γ .

TNF: Factor de Necrosis Tumoral.

TRAF: Factor asociado al receptor TNF.

ARF: del inglés acute renal failure.

FT: factor de transcripción.

RHD: Dominio de Homología Rel.

NF- κ B: Factor Nuclear κ B.

GERP: del inglés, Genomic Evolutionary Rate Profile.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa.

dsDNA: del inglés doble cadena de DNA.

dNTPs: desoxirribonucleótidos.

SEAP: Fosfatasa alcalina secretada.

MCS: Sitio de clonación múltiple.

TA: temperatura ambiente.

4. Abreviaturas de unidades de medición.

μg : microgramos.

ml: miligramos

μl : microlitros.

M: moles.

mM: milimoles

μM : micromoles.

nM: nanomoles.

nm: nanómetros.

picoM: picomoles.

pb: pares de bases

min: minutos (')

seg: segundos (')

Kb: kilobase.

XIV. BIBLIOGRAFÍA.

1. García, M. et al. Global Cancer Facts and Figures (ACS, 2007).
2. Hanahan and Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 ; 100- 57-70
3. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 2004 Sep 17;118(6):671-4.
4. Mantovani A. Cancer: Inflaming metastasis, *Nature* 457: 36-37
5. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1317-22.
6. Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):342-8.
7. Green DR, Evan GI. A matter of life and death. *Cancer Cell*. 2002 Feb;1(1):19-30.
8. Peralta Zaragoza, Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Salud pública de México*. 1997 Octubre 39;5:451-462.
9. Shi L, Nishioka WK, Thing J, Bradbury EM, Litchfield DW, Greenberg AH. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* 1994;263:1143-1145.
10. Yonish RE, Grunwald D, Wilder S Kimchi A, May E, Lawrence JJ. p53 mediated cell death: Relationship to cell cycle control. *Mol Cell Biol* 1993;13:1415-1423 .
11. Horvitz HR. Nobel lecture. Worms, life and death. *Bioscience Reports*. 2003 Oct-Dec;23(5-6):239-303.
12. Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):347-54.
13. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):205-19.
14. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes and Development*. 2001 Nov 15;15(22):2922-33.
15. Abrams JM. An emerging blueprint for apoptosis in *Drosophila*. *Trends in Cell Biology*. 1999 Nov;9(11):435-40.
16. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57.
17. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell*. 2002 Mar;9(3):459-70.

18. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998 Aug 28;281(5381):1312-6.
19. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. 1996 Oct 18;87(2):171.
20. Kumar S, Dumanis J. The fly caspases. *Cell Death and Differentiation*. 2000 Nov;7(11):1039-44.
21. Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L, Litwack G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Spodoptera frugiperda caspase-1, a novel insect death protease that cleaves the nuclear immunophilin FKBP46, is the target of the baculovirus antiapoptotic protein p35. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997 Jan 17;272(3):1421-4.
22. Walker NP, Talanian RV, Brady KD, Dang LC, Bump NJ, Ferez CR, Franklin S, Ghayur T, Hackett MC, Hammill LD, et al. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell*. 1994 Jul 29;78(2):343-52.
23. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
24. Nagata S. Fas ligand-induced apoptosis. *Annual Review of Genetics*. 1999;33:29-55.
25. Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death and Differentiation*. 2003 Jan;10(1):26-35.
26. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 1998 Aug 21;94(4):481-90.
27. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*. 1998 Aug 21;94(4):491-501.
28. Richard S. Hotchkiss, M.D., Andreas Strasser, Ph.D., Jonathan E. McDunn, Ph.D., and Paul E. Swanson, M.D. *Cell Death*. 61:1570-1583, 2009. Mechanisms and diseases.
29. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997 Nov 14;91(4):479-89.
30. Jiang X, Wang X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000 Oct 6;275(40):31199-203.
31. Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes and Development*. 1999 Dec 15;13(24):3179-84.

32. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999 Apr 23;274(17):11549-56.
33. Saleh A, Srinivasula SM, Acharya S, Fishel R, Alnemri ES. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *The Journal of Biological Chememistry*. 1999 Jun 18;274(25):17941-5.
34. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry*. 1999;68:383-424.
35. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Reviews. Mollecular Cell Biology*. 2002 Jun;3(6):401-10.
36. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes and Development*. 1999 Feb 1;13(3):239-52.
37. Miller LK. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends in Cell Biology*. 1999 Aug;9(8):323-8.
38. Hay BA. Understanding IAP function and regulation: a view from *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation*. 2000 Nov;7(11):1045-56.
39. Fesik SW, Shi Y. Structural biology. Controlling the caspases. *Science*. 2001 Nov 16;294(5546):1477-8.
40. Shi Y. A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nature Structural Biology*. 2001 May;8(5):394-401.
41. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 2000 Jul 7;102(1):33-42.
42. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Molecular Cell*. 1998 Jun;1(7):949-57.
43. Gray CW, Ward RV, Karran E, Turconi S, Rowles A, Viglienghi D, Southan C, Barton A, Fantom KG, West A, Savopoulos J, Hassan NJ, Clinkenbeard H, Hanning C, Amegadzie B, Davis JB, Dingwall C, Livi GP, Creasy CL. Characterization of human HtrA2, a novel

- serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *European Journal of Biochemistry*. 2000 Sep;267(18):5699-710.
44. Christich A, Kauppila S, Chen P, Sogame N, Ho SI, Abrams JM. The damage-responsive *Drosophila* gene sickle encodes a novel IAP binding protein similar to but distinct from reaper, grim, and hid. *Current Biology*. 2002 Jan 22;12(2):137-40.
 45. Wing JP, Karres JS, Ogdahl JL, Zhou L, Schwartz LM, Nambu JR. *Drosophila* sickle is a novel grim-reaper cell death activator. *Current Biology*. 2002 Jan 22;12(2):131-5.
 46. Tikoo A, O'Reilly L, Day CL, Verhagen AM, Pakusch M, Vaux DL. Tissue distribution of Diablo/Smac revealed by monoclonal antibodies. *Cell Death Differ*. 2002 Jul;9(7):710-6.
 47. Morizane Y, Honda R, Fukami K, Yasuda H. X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO. *Journal of Biochemistry*. 2005 Feb;137(2):125-32.
 48. Franklin MC, Kadkhodayan S, Ackerly H, Alexandru D, Distefano MD, Elliott LO, Flygare JA, Mausisa G, Okawa DC, Ong D, Vucic D, Deshayes K, Fairbrother WJ. Structure and function analysis of peptide antagonists of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP). *Biochemistry*. 2003 Jul 15;42(27):8223-31.)
 49. Ceballos-Cancino G, Espinosa M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by survivin. *Oncogene*. 2007 Nov 29;26(54):7569-75. Epub 2007 Jun 4.
 50. MacFarlane M, Merrison W, Bratton SB, Cohen GM. Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002 Sep 27;277(39):36611-6. Epub 2002 Jul 16.
 51. Shiozaki EN, Shi Y. Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends in Biochemical Science*. 2004 Sep;29(9):486-94.
 52. Yamaguchi H, Bhalla K, Wang HG. Bax plays a pivotal role in thapsigargin-induced apoptosis of human colon cancer HCT116 cells by controlling Smac/Diablo and Omi/HtrA2 release from mitochondria. *Cancer Research*. 2003 Apr 1;63(7):1483-9.
 53. Zhang XD, Borrow JM, Zhang XY, Nguyen T, Hersey P. Activation of ERK1/2 protects melanoma cells from TRAIL-induced apoptosis by inhibiting Smac/DIABLO release from mitochondria. *Oncogene*. 2003 May 15;22 (19):2869-81.
 54. Chauhan D, Li G, Hideshima T, Podar K, Mitsiades C, Mitsiades N, Munshi N, Kharbanda S, Anderson KC. JNK-dependent release of mitochondrial protein, Smac, during apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003 May 16;278(20):17593-6. Epub 2003 Mar 28.

55. Deng Y, Lin Y, Wu X. TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes and Development*. 2002 Jan 1;16(1):33-45.
56. Zhou LL, Zhou LY, Luo KQ, Chang DC. Smac/DIABLO and cytochrome c are released from mitochondria through a similar mechanism during UV-induced apoptosis. *Apoptosis*. 2005 Mar;10(2):289-99.
57. Reed, J. C. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387, 773–776 (1997)
58. Shimizu, S., Narita, M. & Tsujimoto, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399, 483–487 (1999).
59. Loeffler, M. & Kroemer, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp.Cell Res*. 256, 19–26 (2000).
60. Gross, A., McDonnell, J. M. & Korsmeyer, S. J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 13, 1899–1911 (1999).
61. Mizutani Y, Nakanishi H, Yamamoto K, Li YN, Matsubara H, Mikami K, Okihara K, Kawauchi A, Bonavida B, Miki T. Downregulation of Smac/DIABLO expression in renal cell carcinoma and its prognostic significance. *Journal of Clinical Oncology*. 2005 Jan 20;23(3):448-54. Epub 2004 Nov 30.
62. Sekimura A, Konishi A, Mizuno K, Kobayashi Y, Sasaki H, Yano M, Fukai I, Fujii Y. Expression of Smac/DIABLO is a novel prognostic marker in lung cancer. *Oncology Reports*. 2004 Apr;11(4):797-802.
63. Kempkensteffen C, Jäger T, Bub J, Weikert S, Hinz S, Christoph F, Krause H, Schostak M, Miller K, Schrader M. The equilibrium of XIAP and Smac/DIABLO expression is gradually deranged during the development and progression of testicular germ cell tumours. *International Journal of Andrology*. 2007 Oct;30(5):476-83. Epub 2007 Feb 12.
64. Bao ST, Gui SQ, Lin MS. Relationship between expression of Smac and Survivin and apoptosis of primary hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International*. 2006 Nov;5(4):580-3.
65. Espinosa M, Cantu D, Lopez CM, De la Garza JG, Maldonado VA, Melendez-Zajgla J. SMAC is expressed de novo in a subset of cervical cancer tumors. *BMC Cancer*. 2004 Nov 23;4:84.
66. Arellano-Llamas A, Garcia FJ, Perez D, Cantu D, Espinosa M, De la Garza JG, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. High Smac/DIABLO expression is associated with early local recurrence of cervical cancer. *BMC Cancer*. 2006 Oct 26;6:256.
67. Shibata T, Mahotka C, Wethkamp N, Heikaus S, Gabbert HE, Ramp U. Disturbed expression of the apoptosis regulators XIAP, XAF1, and Smac/DIABLO in gastric adenocarcinomas. *Diagnostic Molecular Pathology*. 2007 Mar;16(1):1-8.

68. Lu C, Chen JQ, Zhou GP, Wu SH, Guan YF, Yuan CS. Multimolecular complex of Par-4 and E2F1 binding to Smac promoter contributes to glutamate-induced apoptosis in human-bone mesenchymal stem cells. *Nucleic Acids Res.* 2008 Sep;36(15):5021-32. Epub 2008 Jul 26.
69. Xie W, Jiang P, Miao L, Zhao Y, Zhimin Z, Qing L, Zhu WG, Wu M. Novel link between E2F1 and Smac/DIABLO: proapoptotic Smac/DIABLO is transcriptionally upregulated by E2F1. *Nucleic Acids Research.* 2006 Apr 14;34(7):2046-55. Print 2006.
70. Yoshikawa H, Nakajima Y, Tasaka K. IFN-gamma induces the apoptosis of WEHI 279 and normal pre-B cell lines by expressing direct inhibitor of apoptosis protein binding protein with low pI. *Journal of Immunology.* 2001 Sep 1;167(5):2487-95.
71. Justo P, Sanz A, Lorz C, Gómez-Garre D, Mezzano S, Egido J, Ortiz A. Expression of Smac/Diablo in tubular epithelial cells and during acute renal failure. *Kidney Int Suppl.* 2003 Oct;(86):S52-6.
72. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell.* 2008 Feb 8;132(3):344-62.
73. Sethi G, Sung B, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside. *Experimental Biology and Medicine (Maywood).* 2008 Jan;233(1):21-31.
74. Shen HM, Tergaonkar V. NFkappaB signaling in carcinogenesis and as a potential molecular target for cancer therapy. *Apoptosis.* 2009 Apr;14 (4):348-63.
75. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annual Reviews Immunology.* 2000;18:621-63.
76. Häcker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Science's STKE.* 2006 Oct 17;2006(357):re13.
77. Nelson DE, Ihekwaba AE, Elliott M, Johnson JR, Gibney CA, Foreman BE, Nelson G, See V, Horton CA, Spiller DG, Edwards SW, McDowell HP, Unitt JF, Sullivan E, Grimley R, Benson N, Broomhead D, Kell DB, White MR. Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science.* 2004 Oct 22;306(5696):704-8.
78. Tergaonkar V. NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(10):1647-53.
79. Fei Chen, Vince Castranova, and Xianglin Shi. New Insights into the Role of Nuclear Factor- κ B in Cell Growth Regulation.
80. Zhao F, Satoda M, Licht JD, Hayashizaki Y, Gelb BD. Cloning and characterization of a novel mouse AP-2 transcription factor, AP-2delta, with unique DNA binding and transactivation properties. *J Biol Chem.* 2001 Nov 2;276(44):40755-60. Epub 2001 Aug 24.
81. Boshier JM, Totty NF, Hsuan JJ, Williams T, Hurst HC. A family of AP-2 proteins regulates c-erbB-2 expression in mammary carcinoma. *Oncogene.* 1996 Oct 17;13(8):1701-7.

82. Williams T, Admon A, Lüscher B, Tjian R. Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Genes Dev.* 1988 Dec;2(12A):1557-69.
83. Williams T, Tjian R. Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Dev.* 1991 Apr;5(4):670-82.
84. Schorle H, Meier P, Buchert M, Jaenisch R, Mitchell PJ. Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature.* 1996 May 16;381(6579):235-8.
85. Zhang J, Hagopian-Donaldson S, Serbedzija G, Elsemore J, Plehn-Dujowich D, McMahon AP, Flavell RA, Williams T. Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature.* 1996 May 16;381(6579):238-41.
86. Hilger-Eversheim K, Moser M, Schorle H, Buettner R. Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene.* 2000 Dec 30;260(1-2):1-12
87. Piao Z, Lee KS, Kim H, Perucho M, Malkhosyan S. Identification of novel deletion regions on chromosome arms 2q and 6p in breast carcinomas by amplotype analysis. *Genes Chromosomes Cancer.* 2001 Feb;30(2):113-22.
88. Kannan P, Buettner R, Chiao PJ, Yim SO, Sarkiss M, Tainsky MA. N-ras oncogene causes AP-2 transcriptional self-interference, which leads to transformation. *Genes and Development.* 1994 Jun 1;8(11):1258-69.
89. Gershenwald JE, Sumner W, Calderone T, Wang Z, Huang S, Bar-Eli M. Dominant-negative transcription factor AP-2 augments SB-2 melanoma tumor growth in vivo. *Oncogene.* 2001 Jun 7;20(26):3363-75.
90. Wajapeyee N, Somasundaram K. Cell cycle arrest and apoptosis induction by activator protein 2alpha (AP-2alpha) and the role of p53 and p21WAF1/CIP1 in AP-2alpha-mediated growth inhibition. (*The Journal of Biological Chemistry.* 2003 Dec 26;278(52):52093-101. Epub 2003 Oct 9.
91. Durst KL, Hiebert SW. Role of RUNX family members in transcriptional repression and gene silencing. *Oncogene.* 2004 May 24;23(24):4220-4.
92. Pluta A, Wrzesien-Kus A. Influence of high expression of Smac/DIABLO protein on the clinical outcome in acute myeloid leukemia patients. *Leukemia Research.* 2010 Oct;34(10):1308-13.
93. Zhang H, Zheng HY. Epigenetic mechanism of RUNX1 in pathogenesis of leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2010 Apr;18(2):525-30.
94. Cameron ER, Neil JC. The Runx genes: lineage-specific oncogenes and tumor suppressors. *Oncogene.* 2004 May 24;23(24):4308-14.

95. Martinez-Velazquez M, Melendez-Zajgla J, Maldonado V. Apoptosis induced by cAMP requires Smac/DIABLO transcriptional upregulation. *Cell Signal*. 2007 Jun;19(6):1212-20.