



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**“IDENTIFICACIÓN DE LA REGIÓN GENÓMICA A LA QUE SE
ASOCIA BIK, EN LAS CÉLULAS DE CÁNCER MAMA
MDA-MB-231”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

PRESENTA:

KAREN AMALINALLI AYALA CONTRERAS

**TUTOR PRINCIPAL: DR. MIGUEL ÁNGEL VELÁZQUEZ FLORES
CO-TUTORES: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA[†] Y
DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Identificación de la región genómica a la que se asocia BIK, en las células de cáncer de mama MDA-MB-231.

Que presenta la pasante: **Karen Amalinalli Ayala Contreras**

Con número de cuenta: 305339760 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 28 de Noviembre de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	
SECRETARIO	<u>M. en C. Tais Nopal Guerrero</u>	
1er. SUPLENTE	<u>M. en C. Maritere Domínguez Rojas</u>	
2do. SUPLENTE	<u>Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo brindado por el Dr. Diego Julio Arenas Aranda[†], por haberme dado en su momento, la oportunidad de ser parte de su excelente grupo de trabajo y brindarme su apoyo y atinados consejos.

De manera general, agradezco el apoyo brindado por parte de la UIMGH (Unidad de Investigación Médica en Genética Humana), y de manera especial al Laboratorio de genómica funcional, en el cual se me permitió realizar el presente trabajo. Contando con el apoyo de las instalaciones por parte del Instituto Mexicano del Seguro Social, e insumos por parte del laboratorio correspondiente.

A la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo, ser ese vínculo académico en la facultad que espero nunca perder y le agradezco mucho el siempre haberme brindado su apoyo durante este proceso.

Y agradezco en especial a mi tutor principal, el Dr. Miguel Ángel Velázquez Flores y la Dra. Ruth Ruíz Esparza-Garrido, por darme la bienvenida en su grupo, apoyarme con la tutela del presente trabajo, su invaluable apoyo, asesoría continua y gran calidad académica, sin la cual no hubiese sido posible el término del presente proyecto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco antes que nada a mi maravillosa familia, a mis padres en especial, sin la cual este trabajo y el camino forjado para llegar hasta aquí, no hubiese sido posible. Les agradezco todas aquellas preocupaciones, desvelos e infinito apoyo durante mi formación académica; que tanto económico como personal, lograron llevarme hasta el lugar en el que me encuentro hoy y me permite desempeñar mi profesión de una manera tan bella; mucho mejor de la que pudiese haber imaginado. Gracias por ser las alas más bellas en este camino y continuar enseñándome.

A mi hermano, muchas gracias por ser aquella persona que me impulsa a ser cada vez mejor, y siempre espero ser un ejemplo que valga la pena seguir y dibuje para ti un mejor camino, yo se que puedes lograr lo que sea que te propongas, sé que sí.

A mi nueva familia, Alan; gracias por ser ese apoyo inagotable en tantos aspectos y mostrarme una vida llena de cosas hermosas por disfrutar. Gracias por ser un ángel tan especial en mi vida y principalmente por no rendirte nunca.

A mis compañeros y amigos tanto de penas como de alegrías muy especiales durante mi estancia: Miguel, Mirna, Mau, Dianita, Sandy y el resto del personal académico de la unidad que en algún momento apoyaron el proyecto. Les agradezco el apoyo que tanto académico como fraternal, hicieron de la estancia en el laboratorio un gran ambiente para trabajar día a día y superar las inclemencias y calamidades de la investigación científica. Siempre tendrán un lugar muy especial en mi corazón.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
ÍNDICE DE TABLAS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
I. RESUMEN	6
II. INTRODUCCIÓN.....	7
CAPÍTULO I. Cáncer de Mama (CaMa)	7
1. El cáncer.....	7
2. La glándula mamaria.....	8
3. Cáncer de Mama (CaMa).....	9
4. Clasificación histopatológica del CaMa.....	11
5. Líneas celulares involucradas en el estudio del CaMa.....	11
CAPÍTULO II. BIK/NBK	15
1. La familia Bcl-2	15
2. BIK (Bcl-2 Interacting Killer).....	16
2.1. Nomenclatura.....	16
2.2. Estructura proteica.....	17
2.2.1. Dominio BH3	17
2.2.2. Dominio N-terminal.....	19
2.2.3. Dominio C-terminal	19
2.3. Localización	20
2.3.1. Localización subcelular	20
2.3.2. Localización tisular	20
2.4. Función	21
CAPÍTULO III. BIK EN LAS CÉLULAS MDA-MB-231.	25
1. Factores de transcripción.....	25
2. Factores de Transcripción con “Cremallera de leucina”	27

3. BIK como posible factor de transcripción.....	30
III. ANTECEDENTES DIRECTOS	32
IV. JUSTIFICACIÓN	33
V. OBJETIVO.....	34
OBJETIVOS PARTICULARES	34
VI. HIPÓTESIS.....	34
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	35
VIII. METODOLOGÍA	36
1. Cultivo celular.....	36
2. Fijación celular “Cross-linking”	36
3. Obtención de cromatina	37
4. Primera digestión del DNA	39
5. Inmunoprecipitación de BIK.....	40
6. Eliminación de señales inespecíficas en la muestra de cromatina –MDA-MB-231: “Pre-clearing del DNA”	40
7. Inmunoprecipitación de la proteína BIK.....	41
7.1. Reversión del entrecruzamiento DNA-Proteína (“Cross-linking”).....	41
7.2. Purificación de DNA.....	42
8. Amplificación del DNA (KIT de amplificación del Genoma Completo).....	43
8.1. Fragmentación.....	43
8.2. Preparación de la librería	43
8.3. Amplificación.....	44
8.4. Purificación del DNA amplificado.....	45
9. Arreglos “Tiling” 2.0 (Affymetrix®).....	46
9.1. Segunda digestión del DNA con DNAsa I.....	46
9.2. Marcaje DNA.....	47
9.3. Hibridación, Lavado y Escaneo	48

IX. RESULTADOS	50
1. Cultivo de la línea celular MDA-MB-231	50
2. Obtención de cromatina de células MDA-MB-231	52
3. Cuantificación de la cromatina.....	54
4. Visualización del DNA las células MDA-MB-231 en geles de agarosa.....	57
5. Digestión I de la cromatina obtenida por CHIP, con la Endonucleasa Micrococcal	58
6. Verificación de la presencia de DNA post-digestión	60
6.1. Cuantificación de DNA.....	60
7. Inmunoprecipitación	61
7.1. Detección de la expresión proteica de BIK en tejido de CaMa.....	61
7.2. Detección de la presencia de BIK por Western Blot.....	62
8. Inmunoprecipitación de BIK en la cromatina de las células de MDA-MB-231.....	63
9. Amplificación del DNA genómico asociado a BIK en las células MDA-MB-231 obtenido por CHIP	64
9.1 Cuantificación de DNA.....	64
9.2. Corrimiento electroforético de la amplificación del DNA con WGA.....	65
10. Purificación y fragmentación del DNA amplificado por el Kit WGA.....	65
10.2. Estandarización de la digestión de DNA II: DNAsa I.....	68
11. Obtención de archivos formato .cel a partir del escaneo de los microarreglos	69
12. Obtención de los sitios de unión a lo largo del genoma de las células MDA-MB-231 a los que se asocia BIK, mediante el uso del software de paquetería R-Bioconductor “Starr”	70
13. Relación de las regiones y genes correspondientes con su descripción en ENSEMBL	72
14. Tabla de funciones encontradas en las proteínas asociadas a BIK	75
15. Interactoma de las proteínas analizadas asociadas a BIK	78
X. DISCUSIÓN.....	81
XI. CONCLUSIONES	93
XII. PERSPECTIVAS	95
XIII. REFERENCIAS.....	96

XIV. APÉNDICE I	103
1. Preparación de Buffers necesarios para la metodología de ChiP	103
XV. APÉNDICE II	105
1. Notas aclaratorias de la metodología de ChiP	105
1.1. Obtención de muestra a usar como control positivo para referencia en inmunoprecipitación de cromatina	105
1.1.1. Extracción proteínas totales de tejido de cáncer de mama para estandarización de condiciones adecuadas para la inmunoprecipitación	105
XVI. APÉNDICE III	106
1. Metodología de estandarización necesaria, aplicada entre los pasos 4 y 5 de la técnica de ChiP	106
1.1. Obtención de muestra a usar como control positivo para referencia en inmunoprecipitación de cromatina	106
1.1.1 Extracción proteínas totales de tejido de cáncer de mama para estandarización de condiciones adecuadas para la inmunoprecipitación	106
1.1.2. Western Blot de BIK en proteínas totales de tejido de CaMa.....	106
1.1.3. Inmunoprecipitación de BIK a partir de proteínas totales de tejido de CaMa; paso previo a la Inmunoprecipitación de cromatina	107

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
Asn	Asparagina
Bcl-2	Proteína 2-Linfoma de células B (<i>B-cell Lymphoma protein 2</i>)
BIM	Mediador Bcl-2 de interacción de la muerte celular (<i>Bcl2-interacting mediator of cell death</i>)
ChIP	Inmunoprecipitación de cromatina
DE	Desviación estándar
DO	Densidad óptica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Factor de crecimiento epidermal (<i>Epidermal growth factor</i>)
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
ENSEMBL	Unión de la base de datos EMBL-EBI y el instituto “ <i>Welcome Trust Sanger</i> ”
EMBL-EBI	Laboratorio de Biología Molecular-Instituto Europeo de Bioinformática (<i>European Molecular Biology Laboratory- European Bioinformatics Institute</i>)
ERBB2	Receptor Tirosin Kinasa 2 (Erb-B2)
FDR	Radio de discriminación de Fisher (<i>Fisher Discriminant Ratio</i>)
Fig	Figura
HIPPIE	<i>Human Integrated Protein-Protein Interaction Reference</i>
ID	Identificación
IUP's	Proteínas llamadas desestructuradas, incapaces de mantener su estructura nativa bajo diferentes condiciones fisiológicas como: migración en geles de poliacrilamida, condiciones reductoras (SDS-PAGE), elevación del diámetro circular (CD) y resonancia magnética nuclear (RMN)
kDa	Kilodalton

Leu	Leucina
ng	Nanogramos
nm	Nanometros
µg	Microgramos
µL	Microlitros
miRNAs	Micro RNAs
mL	Mililitros
mM	Milimolar
M	Molar
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MP	Marcador de peso molecular
PA-HRP	Proteína A (<i>S.aureus</i>) -acoplada a peroxidasa de rábano (<i>Horseradish peroxidase</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reacton</i>)
rfc	Fuerza centrífuga relativa (<i>Relative centrifugal force</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico
SDS-PAGE	Dodecilsulfato sódico-Gel electroforesis
TGFα	Factor de crecimiento transformante alfa (<i>Transforming growth factor alpha</i>)
U	Unidades enzimáticas
UI	Unidades internacionales
v	Volumen
V	Volts

ÍNDICE DE TABLAS

II. INTRODUCCIÓN

Capítulo 1. Cáncer de mama (CaMa)

Tabla 1. Clasificación molecular de los carcinomas mamarios y las líneas celulares provenientes de estos	12
--	----

Capítulo 2. BIK/NBK

Tabla 2. Clasificación generalizada de los factores de transcripción	26
--	----

IV. METODOLOGÍA

Tabla 3. Conteo celular de la cosecha del cultivo de las células MDA-MB-231	37
Tabla 4. Fragmentación de DNA amplificado con Kit WGA	43
Tabla 5. Primera etapa: preparación de la librería de DNA	43
Tabla 6. Segunda etapa: preparación de librería de DNA	44
Tabla 7. Mix para amplificación del DNA obtenido con el Kit WGA	44
Tabla 8. Condiciones de amplificación del DNA obtenido con el Kit WGA	45
Tabla 9. Condiciones óptimas de preparación para digestión del DNA con DNAsa I	46
Tabla 10. Condiciones óptimas de reacción para digestión del DNA con DNAsa I	47
Tabla 11. Condiciones óptimas para hibridación del DNA	48
Tabla 12. Condiciones de reacción para hibridación de DNA	49
Tabla 13. Comprobación de la lisis celular y nuclear para la obtención de cromatina con los buffers de lisis ChIP	53
Tabla 14. Cuantificación de la concentración de DNA en las fracciones celulares de núcleo y citoplasma	54

IX. RESULTADOS

Tabla 15. Cuantificación de la concentración de proteínas totales en las fracciones celulares de núcleo y citoplasma por el método de Bradford	55
Tabla 16. Comparación de la concentración de DNA posterior a la digestión con la Endonucleasa Micrococcal	60
Tabla 17. Cuantificación de DNA obtenido de los sistemas ChIP	63
Tabla 18. Amplificación del DNA asociado a BIK en las células MDA con el Kit WGA (Sigma Aldrich®)	64
Tabla 19. Genes correspondientes a la hibridación de DNA de las células MDA-MB-231 asociado a BIK y su descripción correspondiente en ENSAMB	72
Tabla 20. Tabla de funciones encontradas en las proteínas asociadas a BIK	75

ÍNDICE DE FIGURAS

II. INTRODUCCIÓN

Capítulo 1. Cáncer de mama (CaMa)

Figura 1. Características y capacidades necesarias para el crecimiento tumoral y su progresión	8
Figura 2. Diagrama de la distribución de las estructuras que conforman la mama	8
Figura 3. Representación de la distribución de la incidencia y la mortalidad que representa el CaMa alrededor del mundo	9
Figura 4. Representación gráfica de la incidencia de los casos de CaMa	10
Figura 5. Comparación de células MDA-MB-231 distribuidas por ATCC con las trabajadas en el presente proyecto	14

Capítulo II. BIK/NBK

Figura 6. Representación de la clasificación de los miembros de la familia Bcl-2 en base a su función y estructura	15
Figura 7. Representación de los dominios de la proteína BIK	18
Figura 8. Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis	22

Capítulo III. BIK en las células MDA-MB-231

Figura 9. Esquematización de la clasificación de los FT	26
Figura 10. Estructura conformacional de la cremallera de leucina (LZ)	27
Figura 11. Esquematización del zipper de leucina	29
Figura 12. Resultados arrojados a la búsqueda de BIK en la base de datos UniProtKB	31

III. ANTECEDENTES DIRECTOS

Figura 13. Microscopía confocal de la expresión de BIK en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7	32
---	----

IV. METODOLOGÍA

Figura 14. Diagrama de trabajo de la metodología general	35
Figura 15. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), a partir de las células MDA-MB-231	40

IX. RESULTADOS

Figura 16. Imágenes del cultivo de las células MDA-MB-231	51
Figura 17. Diferencia de la proporción DNA-proteína en la fracción nuclear y citoplasmática de las células MDA-MB-231	56
Figura 18. Visualización de la presencia de DNA en la fracción nuclear y citoplasmática de las células MDA-MB-231	57
Figura 19. Condiciones representativas de la estandarización de digestión de DNA con endonucleasa micrococcal	58
Figura 20. Digestión total del DNA obtenido de las células MDA-MB-231 con la enzima MNasa	59
Figura 21. Determinación de la expresión proteica de BIK por Western Blot	61
Figura 22. Inmunoprecipitación de BIK con el anticuerpo primario anti-BIK (ab52182)	62
Figura 23. Amplificación del DNA asociado a BIK con el Kit (WGA)	65
Figura 24. Eficiencia de la purificación del DNA control positivo, a partir de la amplificación con el Kit WGA	66
Figura 25. Eficiencia de purificación del DNA de las células MDA-MB-231 obtenido con la metodología de ChIP y amplificado con el Kit WG	67
Figura 26. Fragmentación del DNA asociado a BIK	68
Figura 27. Formato de archivos .cel arrojados posteriormente al escaneo de los chips	69
Figura 28. Boxplot del control de calidad de los datos de los arreglos Tiling	70
Figura 29. Plots de intensidad por arreglo	71
Figura 30. Mapa de interacción de las proteínas asociadas al DNA de las células MDA-MB-231	78
Figura 31. Mapa de interacción de las proteínas asociadas al DNA de las células MDA-MB-231	79
Figura 32. Mapa de interacción de las proteínas asociadas al DNA de las células MDA-MB-231	80

I. RESUMEN

La función de BIK/NBK como inductor de la apoptosis, su sobre-expresión en distintos tipos de cáncer de mama y su uso como marcador de pronóstico en cáncer de pulmón, está bien establecida; sin embargo, su participación en la progresión tumoral aún se desconoce. Estudios recientes demostraron que la interferencia de BIK modifica el perfil de expresión de miRNAs y mRNAs involucrados en el control de la autofagia en las células MDA-MB-231 (Datos no publicados). Asimismo, se demostró que BIK se localiza en el núcleo de las células MDA-MB-231 de manera diferencial con su contraparte de células no metastásicas, en la línea celular MCF-7 (Trejo-Vargas, et al., 2015); lo cual pudiera estar asociado con la malignidad de las células MDA-MB-231 y su comportamiento invasivo.

Bajo los antecedentes anteriores, el presente trabajo tuvo como objetivo principal el determinar si BIK está involucrada en la maquinaria de regulación génica de las células MDA-MB-231 mediante interacción directa con su DNA; esto en base a la presencia de un zipper de leucina dentro de su secuencia, el cual podría clasificar a BIK como un posible factor de transcripción.

En base a la técnica de ChIP (inmunoprecipitación de cromatina), podemos decir que en efecto, BIK interactúa directamente con el genoma de las células MDA-MB-231, ya que se logró inmunoprecipitarla a partir del cultivo de estas células. Además, nuestros resultados indican que BIK interactúa con 16,000 regiones genómicas, 29 de ellas con funciones celulares descritas en la base de datos ENSEMBL; y representan 14 genes involucrados en procesos como: angiogénesis linfática, pérdida de la arquitectura normal del epitelio, resistencia a la apoptosis, macropinocitosis, crecimiento metastásico en líneas celulares *in vitro* y crecimiento invasivo de tumores y regulación del crecimiento y la diferenciación celular, procesos de represión transcripcional directa como represión transcripcional e indirectamente como reguladoras implicados en la dinámica de la membrana celular y la motilidad celular, por mencionar algunas.

Por lo que podemos concluir que BIK interactúa de manera directa con el DNA de las células MDA-MB-231 y se requiere de validaciones de tales interacciones y experimentos de valores de las proteínas codificadas por los fragmentos de DNA asociados con y sin la expresión de BIK para demostrar hasta que punto esta interacción contribuye a las características propias de estas células y su agresividad.

II. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I. Cáncer de Mama (CaMa)

1. El cáncer

El cáncer se origina cuando las células de cierto organismo sufren cambios ya sea debido a factores endógenos o exógenos, y se comportan de manera diferente frente a ciertos estímulos, como la muerte celular programada o apoptosis. La acumulación de variantes genéticas que originan inicialmente estas mutaciones: cambios de un solo nucleótido, alteraciones a gran escala como las deleciones, inserciones o re-arreglos cromosómicos. Podría decirse que el factor más importante de las células cancerosas, involucra su habilidad de mantener una proliferación crónica (OMS, 2018).

Los tejidos normalmente controlan cuidadosamente la producción y liberación de señales promotoras de crecimiento que permiten inducir su entrada dentro y su progresión a través del ciclo de división y crecimiento celular, asegurando así una homeostasis en el número celular y el mantenimiento de la arquitectura normal del tejido y su función. Las células cancerosas por otro lado, al desregular estas señales, se convierten en maestras en el desarrollo de un progreso desregulado (Hanahan D y Weinberg R, 2011), en el cual las células transformadas siguen dividiéndose sin detenerse, formando nuevas células anormales, las cuales, tienen la capacidad de invadir o propagarse a otros tejidos al tener influencia sobre las células normales, en las moléculas y en los vasos sanguíneos que las rodean (INC, 2018); las cuales son características presentadas por las células tumorales (**Fig.1**). En la mayoría de los casos, las células cancerosas forman un tumor y con el paso del tiempo estos pueden invadir el tejido adyacente, formando su propio micro ambiente, induciendo a las células normales cercanas a formar vasos sanguíneos que les suministren oxígeno, nutrientes necesarios para su proliferación, eliminación de sus productos de desecho, e incluso la capacidad de evadir el sistema inmune. Capacidades que les confieren a estas células la habilidad de la formación de tumores cancerígenos. (ACS, 2018).



Figura 1. Características y capacidades necesarias para el crecimiento tumoral y su progresión
Tomado y modificado de Hanahan D y Weinberg R, 2011.

2. La glándula mamaria

La mama está compuesta por un conjunto de estructuras: 1) glándulas (llamadas lobulillos), las cuales tienen la función de producir leche; 2) conductos, los cuales están encargados del transporte de la leche desde los lobulillos hacia el pezón; y 3) tejido adiposo, conjuntivo, ganglios linfáticos y vasos sanguíneos (**Fig.2**) (INC, 2018).

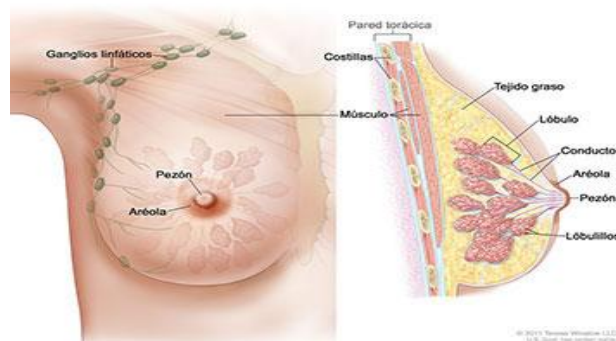


Figura 2. Diagrama de la distribución de las estructuras que conforman la mama
Tomado de INC, 2018.

3. Cáncer de Mama (CaMa)

El tipo más común de cáncer en éste tejido, es el carcinoma ductal. Aunque el cáncer también puede aparecer en las células de los lobulillos y en cualquier otro tejido de la mama. Clasificándose según la localización de su aparición y la ausencia de diseminación fuera del conducto, se distingue: el carcinoma ductal *in situ* (CDIS) y el carcinoma lobulillar *in situ* (CLIS). Entre otras clasificaciones se incluyen: el CaMa invasivo, el cual se disemina desde los ductos y/o lobulillos a los tejidos circundantes; y el CaMa inflamatorio, el cual provoca la inflamación y enrojecimiento de la mama además de ser caliente al tacto, debido a la obstrucción de los vasos linfáticos por las células cancerosas presentes (INC, 2018).

El CaMa, es el segundo cáncer más frecuente entre las mujeres de todo el mundo, tanto en los países desarrollados, como en aquellos en vías de desarrollo y la primera causa de muerte en mujeres hispanas (CDC, 2018). Las estrategias de prevención, aunque reducen en cierta medida el riesgo de desarrollar la enfermedad, no pueden eliminar la mayoría de los casos de CaMa, sobre todo en países en desarrollo donde el diagnóstico de la enfermedad se obtiene en fases muy avanzadas de la enfermedad (Fig.3). Por lo tanto, la detección oportuna que ayudaría a mejorar el pronóstico y la supervivencia de esos casos, representa una piedra angular del control del CaMa, sobre todo para realizarse de manera uniforme a pesar de las diferentes poblaciones y etnias entre las mujeres que lo padecen (OMS, 2018) (Fig.4).

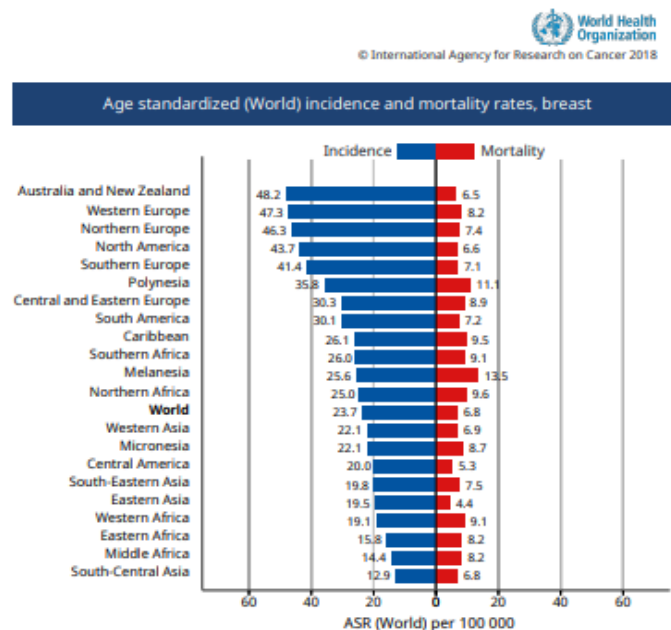


Figura 3. Representación de la distribución de la incidencia y la mortalidad que representa el CaMa alrededor del mundo
Tomado de IARC, 2018

El CaMa representa el 16% de todos los cánceres femeninos y, aunque este cáncer está considerado como una enfermedad del mundo desarrollado, la mayoría de las defunciones por esta causa (69%), se registran en los países en vías de desarrollo (según la OMS, Carga Mundial de Morbilidad, 2012). La incidencia y tendencia varía demasiado alrededor del mundo, con tasas normalizadas por edad de hasta 99.4 por 100 000 en América del Norte, incidencias moderadas pero en aumento en Europa Occidental, América del Sur y Asia Occidental, y la más baja se da en la mayoría de los países africanos, aunque presentan un ligero incremento a través de los años (CDC, 2014).

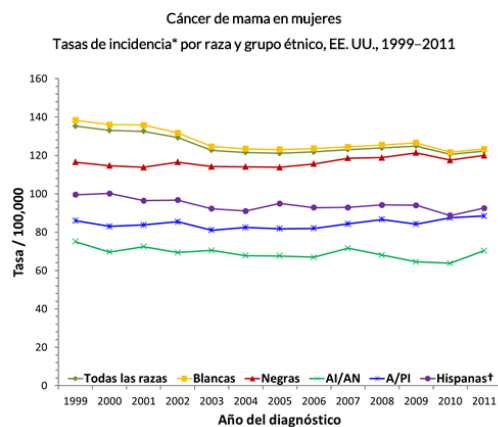


Figura 4. Representación gráfica de la incidencia de los casos de CaMa

En relación con los grupos étnicos de origen y su distribución entre los años 1999 a 2011. (AI= Asiáticas Indoamericanas; AN= Asiáticas Nativas; P= poblaciones de las Islas del Pacífico). Datos del año 2011.

Tomado de CDC, 2014.

Se conocen bien varios factores de riesgo del CaMa, entre los factores reproductivos asociados una exposición prolongada a estrógenos endógenos, una menarquía precoz, menopausia tardía y una edad madura en el primer parto; los cuales figuran entre los factores de riesgo más importantes del CaMa. Las hormonas exógenas también conllevan un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, por lo que las usuarias de anticonceptivos orales y de tratamientos de sustitución hormonal tienen más riesgo que las mujeres que no usan esos productos. Todo lo contrario a la lactancia materna, la cual se considera como un efecto protector (Lacey J, et al., 2009). Sin embargo, en la mayoría de las mujeres afectadas no es posible identificar factores de riesgo específicos (IARC, 2008). Aunque ahora se sabe que los antecedentes familiares del CaMa multiplican el riesgo de dos a tres veces en presentarlo, que algunas mutaciones, sobre todo en los genes BRCA1, BRCA2 y p53, se asocian a un riesgo muy elevado de este tipo de cáncer. Sin embargo, estas mutaciones explican solo una pequeña parte de la carga total de cáncer mamario (Lacey J, et al., 2009).

4. Clasificación histopatológica del CaMa

Analizando desde el punto de vista de la inmunohistoquímica, el CaMa se ha clasificado por las características del tumor en cuatro grupos fundamentales, donde la presencia o no de receptores de estrógenos son definitivos para la categorización de esta clasificación. Así que bajo este criterio, se tienen:

I. Tumores con receptores de estrógenos positivos:

- a. **Luminal A:** Receptores de estrógeno (+), receptores de progesterona (+/-), c-erB-2 (-).
- b. **Luminal B:** Receptores de estrógeno (+), receptores de progesterona (+), c-erB-2 (+).

II. Tumores con receptores de estrógeno negativos:

- a. **HER 2 NEU:** Receptores de estrógeno (-), receptores de progesterona (-), c-erB-2 (+).
- b. **BASAL-LIKE:** Receptores de estrógeno (-), receptores de progesterona (-), c-erB-2 (-) (Uribe J, et al, 2010).

Sin embargo, mediante el uso de microarreglos (Perou et al, 2000; Sorlie et al, 2001; Troester et al, 2004; Bertucci et al, 2005), ha sido posible identificar 5 subtipos de CaMa: Luminal A, Luminal B, basal, con sobreexpresión de ERBB2 y con expresión normal (*normal-like*) de ERBB2. Mostrando un curso clínico y respuesta a agentes terapéuticos diferente entre grupos. Aunque dichos estudios también revelaron un subtipo “mesenquimal” en algunas BCL (*Breast Cell Lines, BCL*) estudiadas, el cual aún no ha sido identificado en muestras tumorales (Charafe-Jauffret E, et al., 2006).

5. Líneas celulares involucradas en el estudio del CaMa

A nivel molecular, el CaMa es una enfermedad compleja y heterogénea, lo cual podría ser la razón por la que los tratamientos son eficientes solo en el 70% de los casos, a pesar de los avances en el diagnóstico temprano y las terapias. Una gran parte del conocimiento sobre los carcinomas mamarios está basado en estudios *in vivo* e *in vitro*, para los cuales se emplean diversas líneas celulares (**Tabla 1**). Las BCL proveen una fuente de material ilimitado, el cuál

es de fácil manejo y auto-replicable, y se encuentra además libre de células contaminantes del estroma (Charafe-Jauffret E, et al., 2006).

Estas células son modelos representativos de los tumores de los cuales se derivan, aunque tienen ciertas limitaciones, ya que representan aislados clonales, los cuales están separados del ambiente del estroma, y su sustento en medios de cultivo podría modificar su fenotipo y llevarlas a la acumulación de alteraciones en su genoma; sin embargo, se ha reportado que, sus propiedades fenotípicas y genotípicas continúan siendo similares por un largo periodo de tiempo (Charafe-Jauffret E, et al., 2006).

Tabla 1. Clasificación molecular de los carcinomas mamarios y las líneas celulares provenientes de estos

Classification	Immunoprofile	Other characteristics	Example cell lines (adapted from [13,22])
Luminal A	ER+, PR+, HER2-	Ki67 low, endocrine responsive, often chemotherapy responsive	MCF-7, T47D, SUM185
Luminal B	ER+, PR+, HER2+	Ki67 high, usually endocrine responsive, variable to chemotherapy. HER2+ are trastusumab responsive	BT474, ZR-75
Basal	ER-, PR-, HER2-	EGFR+ and/or cytokeratin 5/6+, Ki67 high, endocrine nonresponsive, often chemotherapy responsive	MDA-MB-468, SUM190
Claudin-low	ER-, PR-, HER2-	Ki67, E-cadherin, claudin-3, claudinin-4 and claudinin-7 low. Intermediate response to chemotherapy	BT549, MDA-MB-231, Hs578T, SUM1315
HER2	ER-, PR-, HER2+	Ki67 high, trastusumab responsive, chemotherapy responsive	SKBR3, MDA-MB-453

EGFR, epidermal growth factor receptor; ER, oestrogen receptor; HER2, human epidermal growth factor receptor 2; PR, progesterone receptor.

Se muestran las clasificaciones histopatológicas del CaMa, con la expresión respectiva de los marcadores estrogénicos, características de marcadores adicionales y las líneas celulares relacionadas a cada clasificación. En donde se observa que la línea celular MDA-MB-231 tiene características moleculares *Basal-like* (inmunoperfil triple negativo), dentro de un subtipo llamado Claudin-low, el cual presenta una expresión más baja de este marcador. Tomado de Holliday D y Speirs V, 2011.

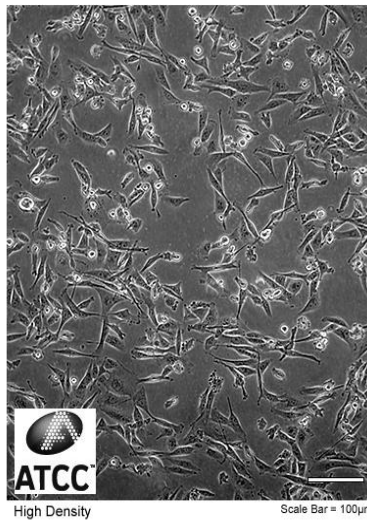
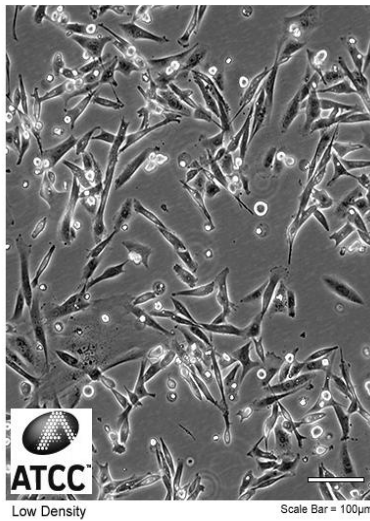
Desde el desarrollo de la primera línea celular humana de CaMa por Lasfargues y colaboradores en 1958 (Lasfargues EY y Ozzello L, 1958), sólo algunas han sido investigadas a fondo para conocer más sobre: la presencia de receptores de membrana para diferentes factores de crecimiento, la acción mitogénica o antimitogénica de diversos fármacos y desde el punto de vista de su dependencia hormonal, etc. De ahí el interés médico y científico de estudiar estas células cancerosas hormonodependientes, para tratar de mejorar el difícil tratamiento de las pacientes que presentan este tipo de CaMa (Molinolo A, 2003).

Uno de los modelos más utilizados para el estudio de células hormono-independientes es la línea celular **MDA-MB-231**, la cual surgió en 1973, cuando Cailleau y colaboradores aislaron tres líneas celulares a partir de derrames pleurales (DP) de pacientes con CaMa avanzado. Ellos observaron que los DP representan una excelente fuente de células tumorales mamarias debido a la alta viabilidad que presentan y a la ausencia de fibroblastos. Después de pruebas a partir de más de 200 muestras diferentes y problemas de sobrevivencia no mayores a días o meses por parte de las células e invasión de los fibroblastos, degeneración o muerte celular; la línea celular MDA-MB-231, se estableció a partir de una única muestra de DP, obtenida el 17 de Octubre de 1973 de una mujer de 51 años a la que se le había practicado una mastectomía radical derecha (Molinolo A, 2003).

El estudio anatomopatológico de la pieza tumoral indicó que se trataba de un carcinoma indiferenciado, con componente ductal y papilar. En Junio y Julio del mismo año, la paciente había presentado un carcinoma intraductal, derrame pericárdico y derrame pleural izquierdo. Los cuales contenían células malignas compatibles con un carcinoma primario de mama. Además, la paciente mostró resistencia e ineficacia al tratamiento con 5-Fluorouracilo y prednisona como parte del tratamiento de quimioterapia, además de una ovariectomía (Molinolo A, 2003).

La paciente falleció el 13 de Enero de 1974, en el (*M. D. Anderson Cancer Center*) Hospital Anderson (Houston, Texas), en el edificio principal (*Main-Building*) y la habitación **231**. En memoria a dicha paciente, se nombró a la línea celular con las iniciales del hospital, el edificio y la habitación de procedencia (Martínez-Carpio P y Navarro M, 2003). Las células MDA-MB-231 actualmente son distribuidas por la ATCC (*American Type Culture Collection, Manassas VA, USA*), provenientes de una efusión pleural metastásica derivada de un adenocarcinoma y descritas como células de tipo epitelial que poseen propiedades adherentes en cultivo. Cromosómicamente aneuploides (rango de 52-68 cercano a la triploidía), con ausencia de los cromosomas 8 y 15 (ATCC, HTB-26, 2000) (**Fig.5**).

A) ATCC Number: **HTB-26**™
Designation: **MDA-MB-231**



B) MDA-MB-231



Figura 5. Comparación de células MDA-MB-231 distribuidas por ATCC con las trabajadas en el presente proyecto

A) Células MDA-MB-231 distribuidas por ATCC, donde se observa una morfología de tipo alargada, fusiforme y fibroblastoide, con crecimiento desordenado, sin unión primaria entre sí y el desarrollo de abundantes filopodios. Células con reporte de origen de expresión del oncogen WNT7B, de los receptores EGF y TGF α . La imagen a la izquierda representa una densidad celular baja y a la derecha se muestra una alta densidad en su crecimiento (sin datos indicativos de horas de mantenimiento y aumento), Tomado de la página web ATCC. B) Células MDA-MB-231 trabajadas en el presente proyecto, con 48h de crecimiento, 1% de antibiótico y 10% de SFB. Se reconocen las mismas características morfológicas señaladas anteriormente aunque a un menor aumento, con una densidad baja y confluencia de un 20% aproximadamente.

CAPÍTULO II. BIK/NBK

1. La familia Bcl-2

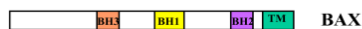
Las proteínas de la familia Bcl-2 están ampliamente caracterizadas como reguladoras del proceso celular de apoptosis. Se agrupan en tres subfamilias, con base en el número de dominios BH (*Bcl-2 Homology*) que poseen: de BH1 a BH4. Las proteínas de esta familia contienen al menos una región de homología Bcl-2, aunque pueden presentar más de una a la vez (Lomonosova and Chinnadurai, 2008).

Tanto en humanos como en roedores, la familia Bcl-2 se divide, considerando su función y dominios en: proteínas multidominio anti-apoptóticas (BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BCL-W y Bfl-1/A1y), las cuales poseen los cuatro dominios BH. El segundo grupo está conformado por las proteínas multidominio pro-apoptóticas (BAX y BAK), las cuales contienen tres dominios BH (BH1-BH3) y juegan un papel crítico en la disrupción de la membrana mitocondrial como parte del proceso de apoptosis. Por último, las proteínas pro-apoptóticas que sólo poseen el dominio BH3 (*BH3-only*; BID, BAD, BIM, PUMA, NOXA y BIK) se encuentran frecuentemente relacionadas como claves en la inducción de la apoptosis (**Fig. 6**). Adicionalmente, toda la familia posee un dominio N-terminal y un dominio hidrofóbico C-terminal, el cual sirve como blanco para su ubicación en citoplasma o membranas intracelulares, particularmente en la mitocondria (Hinds et al., 2007).

1. Anti-apoptotic proteins, BH1-4 – BCL-2, BCL-xL, MCL-1, A1, BCL-w



2. Pro-apoptotic proteins, BH1-3 – BAX, BAK, BOK



3. Pro-apoptotic proteins, BH3-only – BIK, BID, BIM, BAD, PUMA, NOXA, HRK etc



Figura 6. Representación de la clasificación de los miembros de la familia Bcl-2 en base a su función y estructura

Se muestra la presencia de los dominios de homología BH 1 a 4 que da lugar a las subfamilias de Bcl-2 y al dominio transmembranal en común: TM (verde). Destacando la presencia de BIK como proteína pro-apoptótica que solo posee un dominio BH3 (naranja). Tomado de Lomonosova y Chinnadurai, 2008.

2. BIK (Bcl-2 Interacting Killer)

En humanos, el gen de BIK se localiza en la región cromosómica 22q13.3 y codifica para una proteína de 160 aa que contiene un dominio N-terminal, uno transmembranal (TM), un dominio BH3 (15 aa: 57-71) y un dominio C-terminal. (Lomonosova and Chinnadurai, 2008).

2.1. Nomenclatura

BIK es conocida con varios nombres, debido a múltiples reportes de sus diferentes funciones a lo largo del tiempo. En un principio, fue identificada como una proteína que interacciona con E1B-19K, (un potente inhibidor de la apoptosis y homóloga de la proteína Bcl-2 de adenovirus), pero debido a que difería en su estructura y función, se designó como NBK (**Non E1B-19K**) (Han et al., 1996).

También se conoce a BIK según el ortólogo BLK (**BIK-Like Killer**), desde que Hedge y sus colaboradores (1998), identificaron y clonaron una proteína murina nueva, miembro de la familia pro-apoptótica Bcl-2, la cual estaba designada en humanos como BIK, según la base de datos de GeneBankTM. Debido a que esta nueva proteína tenía la misma actividad pro-apoptótica, poseía el dominio BH3, pero se encontraba menos conservada en los dominios N- y C-terminal; y difería de la BIK reportada en humanos en cinco deleciones génicas que la hacían 10 aminoácidos más corta, sin embargo, ya que esta nueva proteína encontrada en ratones era muy similar a la ya reportada, se denominó **BIK-Like Killer** (Hedge et al., 1998).

Aunque, a la fecha no se han reportado isoformas de BIK, predicciones basadas en el análisis de la secuencia genómica de primates sugieren una isoforma más larga de 202 aa; sin embargo, la existencia de dicha isoforma no se ha demostrado experimentalmente (McDonnell, 1999). Adicionalmente, estudios posteriores de análisis filogenético, han sugerido que dentro de las proteínas de la familia Bcl-2, BIK está relacionada de manera más cercana a BAK (Aouacheria, 2005).

2.2. Estructura proteica

Predicciones de estructura secundaria con el programa CLUSTALW, sugieren que la secuencia de BIK forma seis α hélices; a su vez, dicho programa divide a la familia Bcl-2 en dos grupos, en base a la exposición de su dominio BH3: Grupo I) posee el dominio BH3 oculto, y por lo tanto lo más probable es que dependan de un mecanismo de cambio conformacional para inducir su actividad pro-apoptótica. Caso contrario al de BIK, quien pertenece al Grupo II), y posee el dominio BH3 expuesto, por lo cual se puede asumir que funcione como un agonista de la apoptosis al facilitar dicho proceso de manera estructural (McDonnell, 1999).

Adicionalmente, predicciones basadas en el análisis de hidrofobicidad media y de carga neta media, (en donde se buscaban proteínas intrínsecamente desestructuradas o “IUP’s”; dentro de la familia Bcl-2), sugieren que BIK tiene una estructura bien definida. Así es que, en base a estos parámetros se encontró que la mayoría de las proteínas BH3-only (excepto BID) parecen ser no estructuradas, sin embargo, también mostraron que BIK posee una estructura secundaria estructurada en solución a diferencia de las demás proteínas de la familia Bcl-2 (Hinds et al., 2007).

2.2.1. Dominio BH3

Como se mencionó anteriormente, debido a la presencia de un único dominio BH3, BIK se clasifica en la subfamilia *BH3-only*, siendo que fue la primer proteína en la cual la actividad de muerte celular fue relacionada al dominio BH3 de entre los dominios de homología Bcl-2, por lo cual es considerada el miembro fundador de la familia de proteínas *BH3-only*.

Este dominio está conformado por los residuos 9 al 16 de la proteína (**Fig. 7**). En donde análisis filogenéticos de proteínas que lo contienen, sugieren que la región central del dominio está formado por un motivo de siete aminoácidos: LXXXGDE, en donde X puede ser cualquier aminoácido; sin embargo ni la Glicina (G) o el Ácido Glutámico (E) están estrictamente conservados, es decir, que a pesar de estar descrita la composición de aminoácidos del dominio, no existe una conservación estricta (Lanave et al., 2004). Dicho motivo, además de que define a las proteínas *BH3-only*, son capaces de establecer un contacto de crítica importancia con los residuos conservados del canal de unión hidrofóbico en las proteínas de la familia al establecer interacciones (Hinds et al., 2007).

En estudios llevados a cabo para saber si las proteínas podían modificar su unión selectiva a proteínas apoptóticas, se encontró por medio de ensayos de unión *in vitro*, que existen preferencias de la interacción de los péptidos del dominio BH3 de diferentes proteínas *BH3-only* con varias proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (Kuwana et al., 2005). Siendo que algunas proteínas de la familia, como BIM y PUMA tienen una fuerte afinidad por todas las proteínas anti-apoptóticas dentro del experimento, mientras que BID, **BIK** y HRK interactúan de manera más fuerte con BCL-xL, BCL-w y A1. Lo cual se postula está íntimamente relacionado con las diferencias en la secuencia de aminoácidos entre los dominios BH3, ya que mutaciones en estos dominios son capaces de modificar las preferencias de unión de estas proteínas (Letai et al., 2002).

También se sabe que BIK, junto con BID y NOXA, presenta la subclase de péptidos del dominio BH3, llamados: “sintetizadores”, los cuales no activan directamente a BAK (siendo que esta proteína es fundamental para la activación de la apoptosis), ni inducen la liberación de *citocromo c*, sino que se unen a la proteína anti-apoptótica Bcl-2 para desplazar los péptidos BID-like. Mientras que BID y BIM presentan el subtipo de “activadores”, los cuales pueden activar directamente a BAK para oligomerizar e inducir la salida de *citocromo c* y por consiguiente la apoptosis (Letai et al., 2002). Este dominio BH3, es necesario para la dimerización con otras proteínas de la familia Bcl-2 y crucial para la inducción de apoptosis (Lomonosova E y Chinnadurai G, 2008).

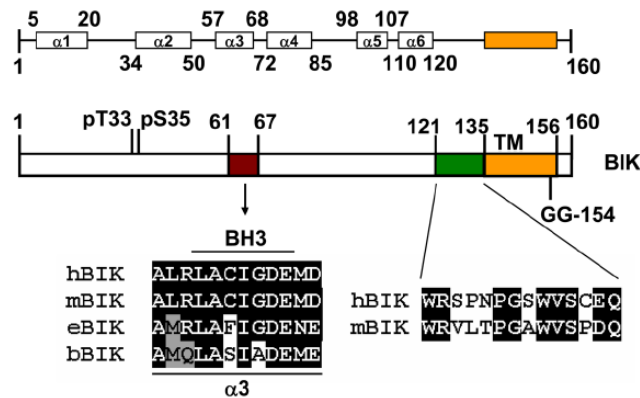


Figura 7. Representación de los dominios de la proteína BIK

Se muestran los dominios TM (amarillo) y BH3 (rojo) de la proteína BIK, así como las regiones α (conformaciones de su estructura secundaria en forma de lámina α) dentro del dominio BH3. Debajo del dominio BH3 se muestran las regiones conservadas de éste entre especies: humano (hBIK), murino (mBIK), equino (eBIK) y bovino (bBIK). También se muestra la región del C-terminal (verde) y los sitios de fosforilación en Thr33 y Ser35. Tomado de Chinnadurai et al., 2008.

Se demostró además que BIK comparte los dominios BH3 y el TM, con otras proteínas de la familia Bcl-2 (**Fig. 7**), y que mutaciones específicas en el dominio BH3 reducen de manera considerable la actividad pro-apoptótica (Boyd et al., 1995). Dichas mutaciones, también afectan de manera simultánea, tanto la unión de las proteínas *BH3-only* a proteínas de la familia Bcl-2, como su actividad proapoptótica. Siendo que estas interacciones del dominio BH3 con las proteínas multi-dominio BH, son cruciales para la actividad de las proteínas *BH3-only*. Sin embargo, la necesidad de esta interacción para presentar una actividad pro-apoptótica completa, parece depender del contexto del miembro *BH3-only* de manera individual (Lomonosova and Chinnadurai, 2008).

2.2.2. Dominio N-terminal

Respecto a la importancia o aportaciones de este dominio a la funcionalidad de BIK, se ha demostrado que los residuos 57-74 del dominio N-terminal constituyen el núcleo necesario para el motivo de heterodimerización, siendo el residuo 57 del dominio N-terminal el que constituye el requerimiento mínimo que necesita BIK para poder realizar dicha heterodimerización con Bcl-2, mientras que residuos adicionales, de hasta 43 aminoácidos se requieren para una interacción más eficiente (Elangovan y Chinnadurai, 1997).

2.2.3. Dominio C-terminal

Por su parte, el dominio C-terminal, el cual se encuentra de manera adyacente al dominio TM, se ha reportado indispensable para la actividad apoptótica bajo condiciones de sobreexpresión transitoria, y ser importante para maximizar la actividad pro-apoptótica de BIK. Este dominio, ha demostrado además, tener semejanza con el motivo de reconocimiento del sustrato presente en varias caspasas, así como a una secuencia presente en las hemolisinas bacterianas, lo cual está relacionado con la capacidad de inducción de la apoptosis de estas proteínas. Aunque en el caso de BIK, aún se tiene que determinar si este motivo es capaz de modular los complejos sustrato-caspasa (Elangovan y Chinnadurai, 1997).

Este dominio C-terminal en BIK, es conservado sólo en humanos y en modelos murinos (**Fig.7**); no obstante, su significancia funcional aún no es clara. A pesar de que BIK se encuentra altamente conservada entre primates, en otras especies de mamíferos, las

secuencias de aminoácidos fuera del dominio BH3, muestran algunas variaciones en su secuencia. Sin embargo, estudios de modelaje molecular, predicen que la estructura secundaria de BIK es similar en todos los mamíferos (Verma et al, 2001).

Adicionalmente, los aminoácidos 121-134 han sido descritos como fundamentales inductores de la muerte celular gracias a estudios con diferentes mutantes de la secuencia de BIK en células MCF-7. Sin embargo, dicha secuencia no está conservada en otros miembros pro-apoptóticos de la familia como Bax, Bak, Bid y Hrk, aunque la actividad bioquímica precisa de la región C-terminal en la proteína, aún es desconocida (Elangovan and Chinnadurai, 1997).

2.3. Localización

2.3.1. Localización subcelular

BIK se localiza de manera predominante en mitocondria, seguido por núcleo, citosol y en retículo endoplásmico (RE) (GeneCards [GC22P043110], 2018); en este último es donde induce la apoptosis celular mediante la vía mitocondrial, regulando la liberación de Ca^{2+} (proceso dependiente de las proteínas BAX y BAK), y coopera a la vez con otras proteínas BH3-*only* como NOXA, con el fin de provocar una rápida liberación de proteínas intramembranales y *citocromo c* de la mitocondria y activar así la apoptosis (Germain, et al., 2005).

BIK es conocida también por inactivar a la proteína Bcl-2 mediante la formación de complejos con ésta en el RE y modular así su actividad. Sin embargo, cuando la proteína Bcl-2, localizada en el RE, se encuentra en exceso, es capaz de tener un efecto protector contra la inducción de la apoptosis por BIK (Zhou et al., 2011).

2.3.2. Localización tisular

Análisis por Northern Blot, han mostrado un patrón claro de la expresión de BIK en tejidos humanos, detectándose mayormente en células epiteliales, siendo expresada en altos niveles en riñón y páncreas; lo contrario a su expresión baja en: placenta, pulmones, hígado, próstata y testículo. Y se observaron tejidos sin señal de hibridación como: corazón, cerebro, músculo esquelético, bazo, timo, ovario, intestino delgado, colon y leucocitos de sangre periférica. Sin embargo, se encontraron casos en los que se encontró una falta de expresión

de Bik/Nbk en tejido linfoide no maligno y colon, mientras que el mRNA de Bik/Nbk parece estar expresado ectópicamente en algunas líneas celulares derivadas de tejido tumoral (Daniel et al, 1999). De manera general, la expresión de BIK, tal y como se mencionó anteriormente, es alta en células epiteliales, tanto en el humano, como en el ratón, sin embargo, se deduce que las variaciones de las regiones promotoras de BIK, entre humanos y ratones, podrían contribuir en los diferentes patrones de expresión que han sido observados (Chinnadurai et al., 2008).

2.4. Función

La apoptosis, una programación de muerte celular intrínseca, la cual asegura la homeostasis tisular y protege a un organismo mediante la eliminación de las células no deseadas o células que podrían representar algún peligro para el organismo, como las células tumorales por ejemplo (Cairão y Domingos, 2010). La mayoría del conocimiento sobre el mecanismo molecular de esta vía intrínseca, derivan de los estudios con el nemátodo *C. elegans* o en mamíferos. En donde dentro de la “vía clásica”, la activación de las caspasas resultan de la formación de un complejo multiprotéico llamado apoptosoma, el cual lo componen CED-4/Apaf-1, la procaspasa-9 y el citocromo *c* (este último solo en mamíferos) (Cairão y Domingos, 2010).

Se conoce que los miembros de la familia Bcl-2, son reguladores importantes de la activación de la caspasa 9, dado que facilitan o previenen la liberación de citocromo *c* de la mitocondria al citoplasma y regula la formación del apoptosoma (**Fig.8**). Los miembros de esta familia también son miembros importantes de la vía intrínseca, ya que regulan la permeabilización de la membrana exterior (MOMP, *por sus iglas en inglés*), y la liberación de factores pro-apoptóticos como el citocromo *c* de la mitocondria. Además de que son reguladores clave de la apoptosis debido a que conectan las vías extrínseca e intrínseca (Cairão y Domingos, 2010).

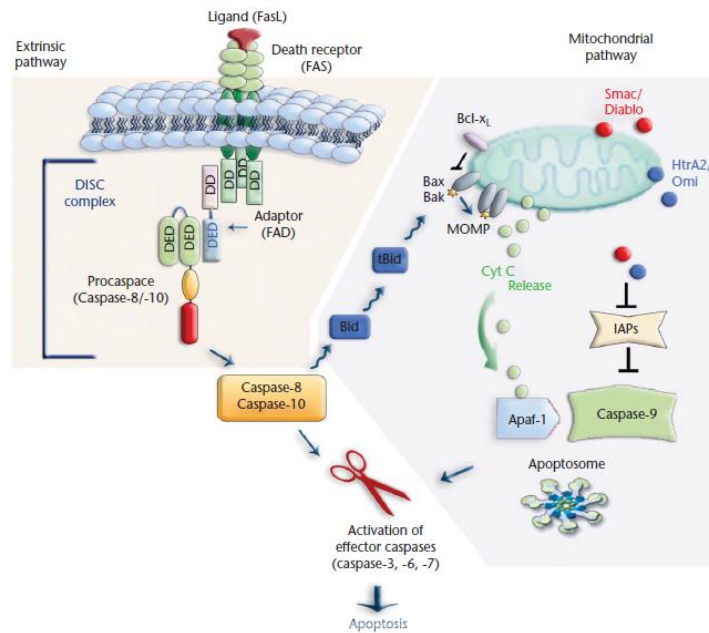


Figura 8. Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis

Se observan las señales de inicio, progresión y terminación en apoptosis de ambas vías, además de la participación de proteínas de la familia Bcl-2 en la conexión entre ellas. Destacando la vía mitocondrial (en la cual participa Bik), y se observan las heterodimerizaciones y liberación del citocromo *c*; eventos característicos en la función de dichas proteínas.

Tomado de Cairão y Domingos, 2010.

En el modelo común de la regulación de la apoptosis por los miembros de la familia Bcl-2, los miembros anti-apoptóticos multidominio, como la propia Bcl-2, se unen y neutralizan a los miembros pro-apoptóticos como Bax o Bik en las células no apoptóticas. Aunque cuando se reciben señales inductoras de muerte celular, los dominios de las proteínas BH3-only inactivan a las proteínas anti-apoptóticas multidominio, liberando proteínas pro-apoptóticas como resultado de esta interacción inhibitoria. Posteriormente las proteínas pro-apoptóticas de la familia, se oligomerizan creando poros en la membrana exterior de la mitocondria, permitiendo así la liberación de citocromo *c* al citoplasma, el cual conduce a la activación de las caspasas y por último la muerte celular. En un modelo alternativo, los miembros anti-apoptóticos de la familia se unen directamente e inhiben los dominios de las proteínas BH3-only, las cuales de otro modo inducen de manera directa la oligomerización de las proteínas pro-apoptóticas multidominio (Cairão y Domingos, 2010).

También se demostró, mediante ensayos de apoptosis transitoria en células HeLa (de la proteína BIK, y sus variantes mutantes expresadas por el vector pCDNA3 junto con el plásmido pCMV, que expresa el gen reportero *lacZ* de *E.coli*, por el método del fosfato cálcico), en las

mismas secuencias mutantes (T33A y S35A), que menos del 10% de las células (que expresan el gen *lacZ*) mostraron características apoptóticas en todas las concentraciones de DNA probadas (0.5-3.0 µg), mientras que cuando se transfectó con BIK *wild type* (*wt*) o una mutante de BIK, la apoptosis se vio incrementada en función a la concentración del DNA; y entre éstas, del 30 al 50 % de las células transfectadas solo con BIK *wild type* (*wt*) presentaron apoptosis dependiente de la concentración de DNA. Mientras que células transfectadas con las BIK mutantes presentaron una muerte celular significativamente menor en todas las concentraciones de DNA, lo que sugiere que las mutaciones en la secuencia de la proteína reduce su actividad apoptótica (Verma et al, 2001).

Se examinó además, el efecto de la fosforilación de BIK con su habilidad de heterodimerizar con la proteína anti-apoptótica Bcl-2; mediante la transfección a células T293 (riñón embrionario humano), de una proteína BIK *wt*, una mutante (T33A/S35A), un vector vacío (pcDNA3-HA) y Bcl-2; en donde se observó que la versión mutante con deficiencias en la fosforilación obtuvo valores similares de formación de complejos con Bcl-2 a la proteína BIK *wt*, lo que sugiere que la fosforilación de BIK en sus residuos de treonina y serina aparentemente no tienen una influencia significativa para su afinidad por Bcl-2 (Verma et al, 2001). Por otro lado, mutaciones que mimetizan la fosforilación (cambios de Thr y Ser por Asp), mejoran la actividad pro-apoptótica de BIK y su interacción con BCL-xL y Bcl-2 (Li et al, 2003). Cabe destacar que dicho proceso de fosforilación que es requerido para la actividad pro-apoptótica mediada por BIK, representa un papel contrario de fosforilación de otras proteínas BH3-*only* como BAD (Verma et al, 2001).

En humanos, BIK parece jugar un papel crítico en la homeostasis de los linfocitos B, esto fue observado en un estudio de perfil de expresión del centro germinal de reacción (donde se observó la expresión como respuesta a estímulos y el desarrollo de las células germinales), en donde se indujo la activación de *BIK*, además de la adición *in vitro*, de otros genes pro-apoptóticos como *FAS*. Este trabajo demostró que durante la transición de células B *naive* (Linfocitos B sin estímulos previos a un antígeno) a centroblastos, que los genes estudiados continuaron regulados a la alta en las células B de memoria (Linfocitos B con previo contacto a un antígeno, y generación de memoria contra este) (Klein et al., 2003). Asimismo, este estudio junto con otros relacionados, sugieren entonces que BIK pudiera ser importante en la selección de linfocitos B maduros mediante la apoptosis (Chinnadurai et al., 2008). Otra de las funciones de BIK, es que parece ser un efector crítico en la inducción de la apoptosis por toxinas, citocinas e infecciones virales. Aunque también parece ser un blanco prominente para drogas anti-cáncer que inhiben funciones del proteosoma (Klein et al., 2003).

BIK está clasificada como una fosfoproteína, lo cual se refiere a que es capaz de ser fosforilada en la treonina 33 (Thr 33) y en la serina 35 (Ser 35) de su secuencia por una caseína cinasa: “cinasa II-like”. En experimentos donde se buscaba encontrar cuál de los dos residuos constituía el sitio de fosforilación de BIK, mediante la sustitución de uno de ellos por una Alanina (mutantes T33A y S35A), se encontró que ambas mutantes eran ineficientes para la fosforilación, sugiriendo que tanto la Treonina como la Serina son requeridas para la fosforilación de BIK. Además de que las secuencias mutantes de BIK, no demostraron alterar ni la vida media, ni algún patrón de localización subcelular, en comparación con la BIK *wt* (Verma et al, 2001).

Dentro de las funciones de la proteína BIK como un marcador de pronóstico del cáncer, esta proteína ha sido utilizada como una molécula terapéutica en terapia génica basada en avances para cáncer de difícil tratamiento (Chinnadurai et al., 2008). Esto con base en lo que se sabe de la expresión de BIK en diferentes tipos de cáncer; por ejemplo, se ha observado paradójicamente su sobre-expresión en ciertos tumores de mama (García et al, 2005), y en cáncer de pulmón de células no-pequeñas (NSCLC, *por sus siglas en inglés*), por ejemplo; se encontró una correlación de la sobre-expresión de BIK con una prognosis pobre (Lu et al, 2006). En otros casos donde el incremento en la expresión de BIK, también coincide con el incremento en la expresión de la proteína Bcl-2, sugiere que la actividad pro-apoptótica de BIK puede ser controlada por Bcl-2 durante la tumorigénesis y que un nivel bajo de muerte celular sea mediado por una vía de escape de BIK, lo que a su vez, podría llevar a una adaptación de las células tumorales y a la evolución de su agresividad (Sowter et al, 2003).

De manera funcional, la proteína BIK, aunque no ha demostrado ser esencial para el desarrollo, en base a estudios en animales. Aunque se encontró que BIK depende de la interacción con BIM (proteína pro-apoptótica *BH3-only*), para cumplir ciertas funciones celulares (Klein et al, 2003). Se sabe también, que BIK funciona como un supresor de tumores en varios tejidos humanos y su expresión en cáncer es prevenida por pérdidas cromosómicas que abarcan el locus de *BIK* o por silenciamiento epigenético de manera natural (Daniel et al., 1999).

CAPÍTULO III. BIK EN LAS CÉLULAS MDA-MB-231.

1. Factores de transcripción

Los factores de transcripción (FT) son proteínas involucradas en el proceso de convertir o transcribir DNA en RNA. Los FT incluyen un gran número de proteínas, y una de sus características principales es que poseen dominios de unión a DNA: DBD (*DNA-binding domain*), los cuales, les dan la habilidad de unirse a secuencias específicas de DNA llamadas “enhancer” o “secuencias promotoras”. Algunos de los FT se unen a una secuencia promotora cercana al sitio de inicio de la transcripción y ayudan a formar el complejo de iniciación de la transcripción. Por otro lado, los que se unen a secuencias regulatorias como las secuencias enhancer pueden estimular o reprimir la transcripción de un determinado gen. Dichas secuencias regulatorias pueden ubicarse a cientos de pares de bases río arriba o río abajo del gen que se está transcribiendo. La regulación de los FT permite la expresión única de cada gen en diferentes tipos celulares y durante el desarrollo de las mismas (Phillips T y Hoopes L, 2008).

Para clasificar a los factores de transcripción, se ordenan en un esquema de 6 niveles; 4 de ellos son abstracciones en base a diversos criterios. El nivel 5 representa genes FT y el 6, lo componen productos génicos individuales. Juntas, dichas clasificaciones suman 9 superclases identificadas, las cuales comprenden 40 clases y 111 familias. Dentro de las cuales los niveles se denominan bajo ciertas definiciones de rangos (**Tabla 2**) (Wingender E, Schoeps T y Dönitz J, 2012).

Tabla 2. Clasificación generalizada de los factores de transcripción

Level	Rank denomination	Definition	Example
1	Superclass	General topology of the DBD	Zinc-coordinating DBDs (Superclass 2)
2	Class	Structural blueprint of the DBD	Nuclear receptors with C4 zinc fingers (Class 2.1)
3	Family	Sequence and functional similarities	Thyroid hormone receptor-related factors (NR1) (Family 2.1.2)
4	Subfamily	Sequence-based subgroupings	Retinoic acid receptors (NR1B) (Subfamily 2.1.2.1)
5	Genus	TF gene	RAR- α (Genus 2.1.2.1.1)
6	Factor 'species'	TF polypeptide	RAR- α 1 (Species 2.1.2.1.1.1)

Se muestran los niveles de clasificación en la primera columna, y se indica su correspondiente denominación y ejemplo de las características de las proteínas que las componen.

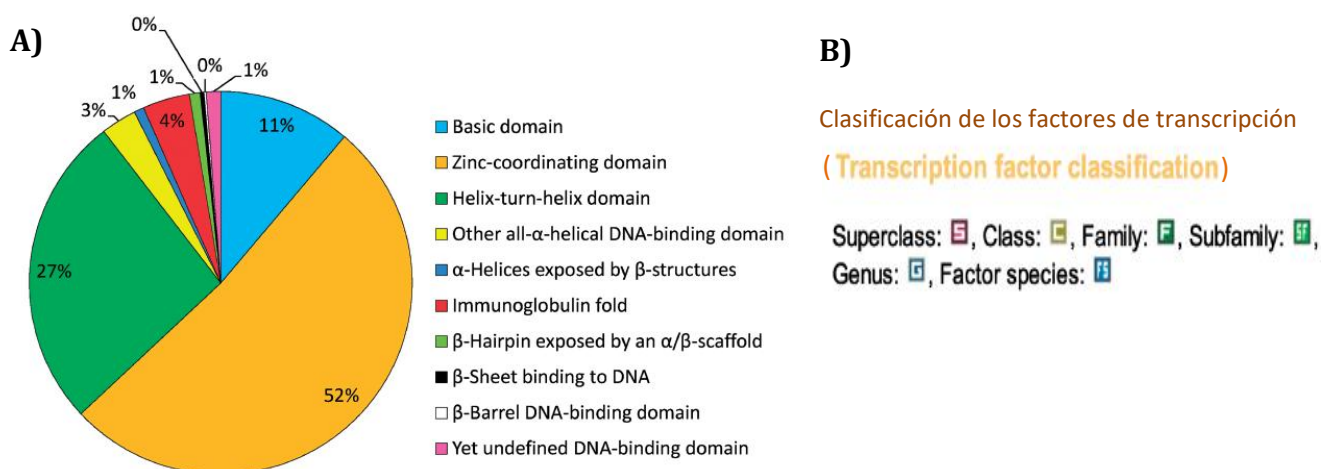


Figura 9. Esquematzación de la clasificación de los FT

A) Proporciones relativas de las superclases de FT en humanos. La distribución de los géneros de FT entre las 10 superclases se indica con los porcentajes correspondientes. **B)** Datos de clasificación mostradas en la interfase web de la **TFClass** (*Transcription factors classification*) en donde se puede encontrar información dentro de la base de datos de alguna proteína de interés dentro de estas clasificaciones. Tomado de Wingender E, Schoeps T y Dönitz J, 2012.

Alteraciones en la expresión génica de estas proteínas, causadas a nivel de estructura que conlleven a una función inapropiada en los reguladores transcripcionales, se han asociado con diversas enfermedades humanas, incluyendo ciertos tipos de cáncer y desórdenes del desarrollo. Estudios sobre estas alteraciones han demostrado que 164 factores de transcripción están directamente relacionados con 277 enfermedades (Farnham P, 2009).

2. Factores de Transcripción con “Cremallera de leucina”

La cremallera de leucina, “zipper de leucina” (**LZ**, por sus siglas en inglés), se denominó así debido a la presencia de repetidos de Leucina (Leu) en la secuencia primaria de ciertas proteínas. La identificación del factor de transcripción y oncoproteína: Jun -en 1988 por Landschulz y col.-, causó bastante interés debido a la caracterización de su interfase de dimerización y su motivo de repetición de leucinas, el cuál fue llamado por primera vez: “zipper de leucina o LZ”.

Actualmente, los zippers de leucina se han descrito como cadenas dobles de estructuras helicoidales “left-handed”, (que forman una “súper-hélice” o “cola enroscada”) (**Fig. 10. I**), y tienen un patrón repetitivo de leucinas (el número de repetidos en la cremallera depende de la proteína que se trate), estas leucinas son seguidas por seis residuos más (igualmente dependientes de la proteína que se trate); y juntos forman un heptámero en cada hélice (**Fig. 10. II**) (Bornberg-Bauer, et al., 1998).

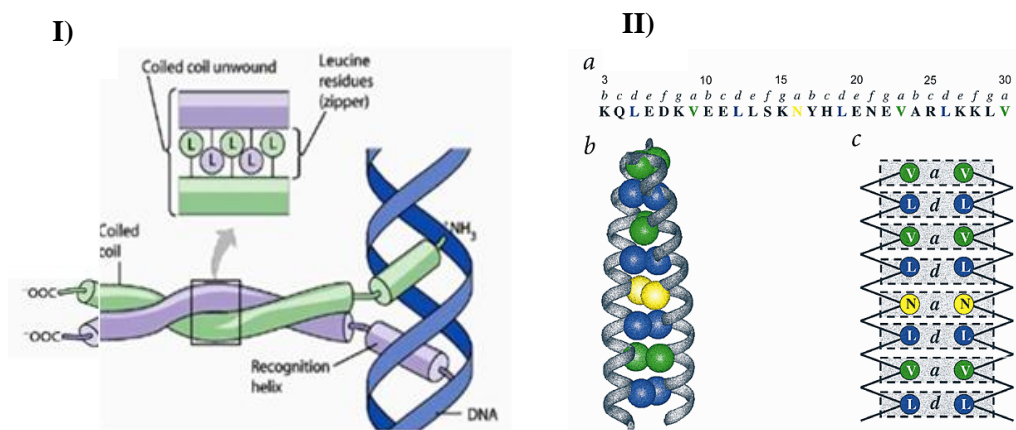


Figura 10. Estructura conformacional de la cremallera de leucina (LZ)

I) Se observan las estructuras que conforman dicha cremallera en ambas hélices que forman la “coiled coile”, o cola enroscada: el extremo C-terminal, las repeticiones de leucina en el núcleo de la cola, y el extremo N-terminal, de unión al DNA. **II)** Se ejemplifica la organización de la cremallera mostrando el péptido en base a la estructura primaria de la secuencia de la proteína GCN4-LZ (“General control protein”) (a), y su reacomodo en estructura secundaria (b) y los residuos que lo componen (c), en donde se resaltan las posiciones *d* (azul), las posiciones *a* en verde (excepto el residuo de Asn central en amarillo). Tomado y modificado de Bowie J, 2000.

Los residuos dentro de la secuencia de la cremallera se ubican de acuerdo a las letras *a-g* (**Fig.11.A**), en donde *d* se refiere a la primer leucina, siendo que es importante que se trate de este aminoácido, para brindar flexibilidad a la cadena dentro de la secuencia. Las posiciones *a* y *d*, son comúnmente ocupadas por residuos hidrofóbicos, ya que de esta manera estabilizan la interfase helicoidal del núcleo de la hélice, por lo que representan el mayor factor estabilizante. Por otro lado, las posiciones *e* y *g*, tienden a estar cargadas para que la habilidad de formar puentes salinos pueda ayudar significativamente a especificar la orientación y el patrón de dimerización de la cremallera (Bornberg-Bauer et al., 1998).

Finalmente, las posiciones *b*, *c* y *f* son ocupados frecuentemente por residuos hidrofílicos, pero poco conservados (**Fig. 11.B**) y estos se encuentran expuestos a los solventes del medio en el que interactúan; siendo que tal característica cobra importancia debido a que la especificidad de la dimerización de los ZL depende de las condiciones del solvente en el que desarrollen su función, por ejemplo, el pH. Dicho fenómeno, es particularmente significativo para muchas oncoproteínas que sufren dimerización en los pares competitivos: **Jun-Jun** y **Jun-Fos**, o **Myc-Max** y **Max-Max** (Bornberg-Bauer et al., 1998). La mayoría de las cremalleras de leucina bZIP contienen valinas en la posición *a* y leucinas en la posición *d*. Respecto a esta conformación se observó por Harbury y colaboradores (Harbury et al, 1993), que cuando se cambian ambos aminoácidos por Isoleucina, la conformación de las cremalleras de leucina cambia de formar dímeros a trímeros (Krylov D y Vinson C, 2001).

Como subclasificación, a las proteínas con cremallera de leucina que tienen además un segmento adyacente al motivo de repeticiones de leucinas en el extremo N-terminal compuesto por 20 aminoácidos, enriquecido por residuos básicos, son conocidas como zippers básicos o proteínas “bZIP”. Dicho segmento o región básica (RB) (**Fig. 11.A**), está le da a la proteína la facilidad de unirse al DNA mediante la interacción con los grupos fosfatos cargados negativamente en el DNA (Hakoshima T, 2005). Ejemplos de dichas proteínas bZIP son: Fos, Jun, CREB/ATF, ATF2, 3 y 4 y AP1 (Bornberg-Bauer et al., 1998).

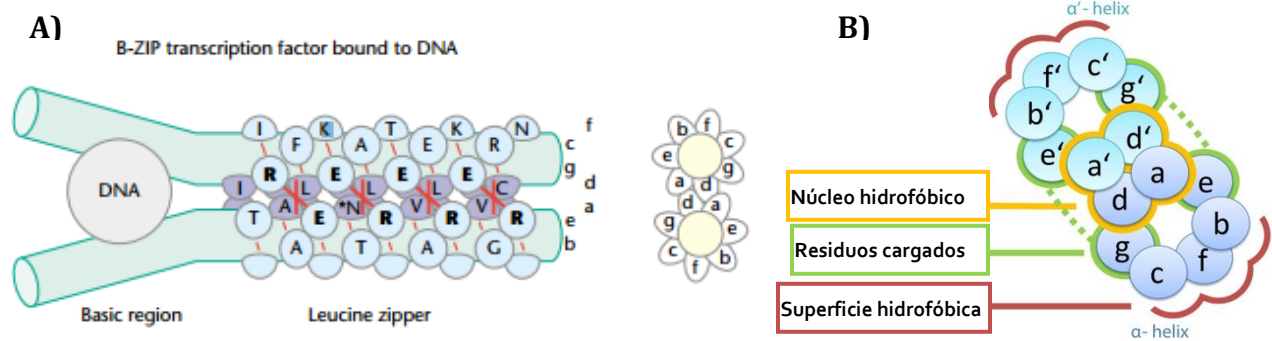


Figura 11. Esquemización del zipper de leucina

A) Se muestra una representación de la conformación de tijera adoptada por el motivo de zipper de leucina en algunos factores de transcripción, en donde se observa la ubicación de las leucinas en el núcleo de la estructura conformando un sitio hidrofóbico y la organización de los sitios *a-g*, con un ejemplo de los residuos que los representan. Se señala también la región básica de unión al DNA. Tomado y modificado de Krylov D y Vinson C, 2001. **B)** Se observa con mejor detalle la esquematización de la organización de los residuos en la cremallera, señalando el núcleo hidrofóbico (amarillo) que conforman las posiciones *a* y *d* de ambas hélices, los residuos cargados (verde) y la superficie hidrofílica externa formada por las posiciones *c*, *b* y *f*. Tomado y modificado de Llorca C, Potschin M y Zentgraf U, 2014.

Para saber si una proteína de interés contiene un ZL, es posible realizar una predicción mediante algoritmos, con una precisión razonable, con base a la estructura de cola enroscada, la cual es encontrada de manera característica y frecuente en los zipper de leucina y es requerida para la dimerización de la proteína. El programa **2ZIP** combina un algoritmo de predicción estándar de la cola enroscada con una aproximación característica de las repeticiones de leucina; esta combinación supera de manera significativa los métodos existentes, debido a que la predicción está basada en los patrones de repetidos de leucina en conjunto con la estructura de cola enroscada, además de que evita los altos niveles de falsos positivos obtenidos con otros programas que surgen cuando analizan solo las repeticiones de leucina y estos contienen muchos errores en las anotaciones de secuencias encontradas en las bases de datos en las que se basan (Bornberg-Bauer et al., 1998).


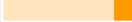
3. BIK como posible factor de transcripción

Cuando surge la pregunta de cómo influyen los factores de transcripción en la regulación de genes y la manera en que funcionan todas las interacciones mencionadas anteriormente con el DNA, es evidente la importancia de los recientes avances en técnicas como la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP, por sus siglas en inglés), seguida de microarreglos (ChIP-chip), o de secuenciación (ChIP-seq), y de algunas otras similares como DamID, las cuales permiten crear un mapa global de interacciones específicas de DNA-proteína en cierto tipo de células con un solo experimento (Farnham P, 2009).

Cabe mencionar que bajo la clasificación de los FT descrita anteriormente; el dominio de zipper de leucina predicho que posee BIK según la base de datos UniProtKB [Q13323] (**Fig. 12**), en base a su estructura y los lineamientos de clasificación mencionados anteriormente, éste se clasificaría como: 1) Superclase: Dominios Básicos y 2) Clase: Factores básicos de zipper de leucina (bZIP). Y para las demás subclasificaciones restaría identificar su función como tal para poder completar los niveles de 3) Familia, 4) Subfamilia, 5) Género y 6) “Especies” Factor.

A) Family & Domainsⁱ

Region

Feature key	Position(s)	Length	Description	Graphical view	Feature identifier	Actions
Region ⁱ	137 - 158	22	Leucine-zipper 			Add BLAST

Motif

Feature key	Position(s)	Length	Description	Graphical view	Feature identifier	Actions
Motif ⁱ	57 - 71	15	BH3			Add BLAST

Domainⁱ

Intact BH3 motif is required by BIK, BID, BAK, BAD and BAX for their pro-apoptotic activity and for their interaction with anti-apoptotic members of the Bcl-2 family.

Sequence Feature

Entry & Position(s)	Q13323[137-158]
Description	Bcl-2-interacting killer, Homo sapiens
Feature key	Region
Feature Identifier	

```
      10      20      30      40      50
MSEVRPLSRD ILMETLLYEQ LLEPPTMEVL GMTDSEEDLD PMEDFDSLEC
      60      70      80      90     100
MEGSDALALR LACIGDEMVD SLRAPLAQL SEVAMHSLGL AFIYDQTEDI
      110     120     130     140     150
RDVLRSFMDG FTTLKENIMR FWRSPNPGSW VSCEQVLLAL LLLALLLPL
      160
LSGGLHLLK
```

B)

Figura 12. Resultados arrojados a la búsqueda de BIK en la base de datos UniProtKB

A) Resultados arrojados por la búsqueda de BIK, sección de familia y dominios, en donde se menciona la predicción de un zipper de leucina por análisis de secuencia. Se observa en la imagen la posición de la cremallera en los residuos 137-158 y su longitud de 22 aa. **B)** Se muestra el resultado de la vista gráfica del zipper de leucina, en donde se muestra la secuencia completa de BIK y se señala en amarillo la región que corresponde a la predicción del ZL. Tomado de la página web de UniProtKB, 2002-2016.

III. ANTECEDENTES DIRECTOS

Estudios realizados en el laboratorio de genómica funcional del hospital de pediatría CMNSXXI, demostraron por inmunohistoquímica de fluorescencia, que la expresión proteica de BIK era diferente en las líneas celulares de CaMa: MCF-7 y MDA-MB-231 (Trejo-Vargas A et al., 2015), esto en base a que se observó que la expresión de BIK en la línea MDA-MB-231 parecía situarse tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células. Caso contrario en las células MCF-7, en las cuales solo parecía encontrarse en el citoplasma. La presencia de BIK en el núcleo de las células MDA-MB-231 se demostró posteriormente mediante microscopía confocal (**Fig.13**), en la cual solo se observó una señal co-localizada (rosa) de la proteína dentro del núcleo de estas células y no en las MCF-7 (Datos no publicados), siendo que en las bases de datos no se menciona que esta localización de BIK haya sido observada anteriormente.

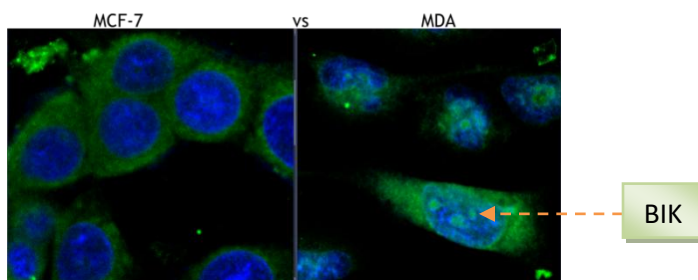


Figura 13. Microscopía confocal de la expresión de BIK en las líneas celulares MDA-MB-231 y MCF-7

Núcleos marcados con DAPI (*4',6-diamino-2-fenilindol*) (azul); contraste citoplasmático con anticuerpo anti-BIK (*Abcam#52182*) en rojo. En MCF-7, la señal de BIK (rojo) se observa exclusivamente a nivel citoplasmático, mientras que en el caso de las células MDA la señal de la proteína co-localiza con el colorante nuclear observándose una coloración rosada en la señal ubicando a BIK dentro del núcleo. Datos no publicados.

Dado que una de las funciones conocidas de mayor relevancia de BIK, es la de ser una proteína pro-apoptótica y que en diversos estudios se postula como una posible opción terapéutica para el cáncer; el que García y colaboradores (2005), demostraran que desde un nivel de transcrito, del gen BIK se encuentra sobre-expresado en 14 de 15 muestras de CaMa de diferentes estadios de progresión, y que Lu y colaboradores en el 2006 demostraron también una sobre-expresión a nivel de proteína en un estudio de cáncer pulmonar de células no pequeñas Etapa I, coloca a BIK como una proteína de alta relevancia para una mejor comprensión de la progresión del cáncer y de manera especial en el de mama.

IV. JUSTIFICACIÓN

El que BIK sea una proteína pro-apoptótica y que se haya demostrado su presencia en el núcleo de las células MDA-MB-231 (Trejo-Vargas A et al., 2015), las cuales ejemplifican un tumor de CaMa de alto grado (metastásico) (Human Breast Adenocarcinoma Cell Line, 2013), sugiere que esta proteína posee otras funciones celulares que podrían contribuir en la agresividad de estas células; su regulación génica entre ellas.

Con base en esta información, y la discrepancia de reportes sobre la localización diferencial de BIK en el núcleo de líneas celulares de CaMa y otros tipos de cáncer, surge la relevancia de su estudio con el fin de una mejor comprensión del funcionamiento molecular de la proteína y la participación de ésta en el CaMa.

La importancia del estudio del CaMa radica en que representa la neoplasia más frecuente entre mujeres, con un estimado de 2.089 millones de nuevos casos de cáncer diagnosticados en 2018 (con el 11.6 % de todos los casos de cáncer). A pesar de que es la quinta causa de muerte por cáncer (627 mil muertes al año), el CaMa es la primera causa de muerte más común en mujeres mayores de 35 años. (Globocan, 2018). Además de presentar una alta incidencia tanto a nivel mundial como en la población mexicana. En esta última, se observa un promedio de 10 decesos al día, siendo que en los últimos 10 a 20 años las muertes por esta enfermedad han aumentado, mientras que en Europa y Estados Unidos han disminuido dramáticamente (con un 80% de sus pacientes diagnosticadas en la primera etapa), mientras que en México se tiene el mismo porcentaje pero de mujeres diagnosticadas en etapas 3 o 4 cuando los tratamientos son limitados (DGCS-UNAM, 2018).

V. OBJETIVO

Se determinarán la(s) región(es) genómica(s) a la que se asocia la proteína BIK, mediante la técnica de ChIP (inmunoprecipitación de cromatina), en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, para identificar su probable función como factor de transcripción en estas células.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer las condiciones de cultivo de la línea celular de cáncer de mama, MDA-MB-231.
- Inmunoprecipitar el DNA de la línea celular MDA-MB-231, mediante la técnica de inmunoprecipitación de cromatina “ChIP” (*Chromatin Immunoprecipitation*).
- Identificar los sitios genómicos de interacción de BIK con el DNA de las células MDA-MB-231, por medio de microarreglos de tipo Tiling.
- Analizar con herramientas bioinformáticas los resultados obtenidos en los microarreglos.

VI. HIPÓTESIS

Si la proteína BIK interacciona de manera directa con el genoma de las células de cáncer de mama MDA-MB-231, su identificación será posible mediante la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

DIAGRAMA DE FLUJO DE LOS MÉTODOS QUE SE EMPLEARON PARA LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE PROYECTO

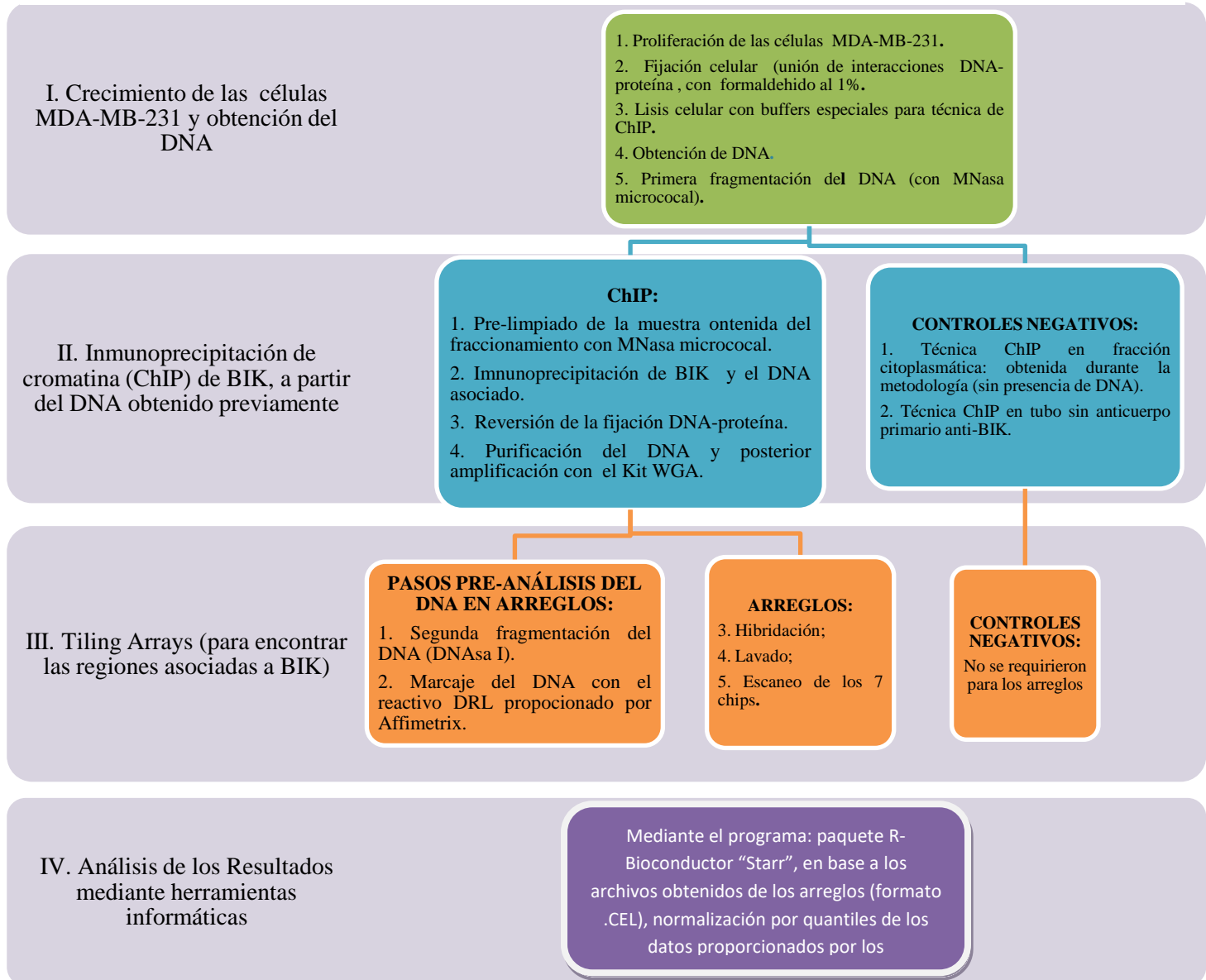


Figura 14. Diagrama de trabajo de la metodología general

VIII. METODOLOGÍA

1. Cultivo celular

Las células de cáncer de mama MDA-MB-231 (American Type Culture Collection: ATCC, Manassas, USA) se crecieron y mantuvieron en medio de cultivo DMEM-F12 (GIBCO, Life Technologies), con una saturación de CO₂ al 5%, y una temperatura constante de 37°C. La fijación celular “cross-linking”, para la obtención de la cromatina, se realizó en cajas Petri de poliestireno de 100 mm x 20 mm de diámetro, con tratamiento CT para favorecer la adhesión celular (Corning® 430167).

La búsqueda de las condiciones adecuadas para el cultivo de las células, consistió en la determinación del volumen óptimo de medio de cultivo, así como del empleo u omisión de antibiótico. Se probaron diferentes volúmenes de medio DMEM-F12 (6-12 mL), así como el uso de Penicilina 10, 000 UI/mL/ Estreptomina 10, 000 µg/mL, usado al 1%), y se encontró que el óptimo crecimiento celular ocurrió en presencia de 10 mL de DMEM-F12 con suero fetal bovino al 10%, y en ausencia de antibiótico.

La confluencia celular empleada para los experimentos fue del ~95% y se alcanzó en un promedio de 5 días de cultivo. Las células, una vez fijadas y recuperadas en un tubo cónico de 15 mL con previa tripsinización, se contaron con una cámara de Neubauer, y se procesaron para la obtención de cromatina.

El cambio del medio de cultivo se realizó aproximadamente cada 72 horas; antes de agregar el medio de cultivo nuevo, se realizaron lavados con PBS 1X estéril.

2. Fijación celular “Cross-linking”

Una vez que las células alcanzaron una confluencia mayor al 95%, éstas se fijaron, directamente en el medio de cultivo, con una concentración final de formaldehído al 1%. Para ello, las células se mantuvieron en agitación constante y a temperatura ambiente (~25°C) durante 10 minutos. La fijación se detuvo bajo las mismas condiciones, al incubar con una concentración de glicina final de 0.125 M durante 5 minutos.

3. Obtención de cromatina

Debido a la omisión de puntos clave para la realización de la técnica de ChIP en diferentes artículos científicos, en este estudio se estableció una metodología en la que se incluyeron procedimientos de diversos reportes (Gozani Lab, 2005; Cold Spring Harb Protoc, 2009; Denisov S y Brinkmann, 2005).

Una vez fijadas las células, se desechó el medio de cultivo, y las células se despegaron de las cajas agregando 2 mL de 0.25 % Tripsina/ EDTA (1X) e incubando a 37°C por 10 minutos; la reacción se detuvo con 3 mL de medio de cultivo.

Posteriormente, las células se rasparon de la superficie de la caja y se lavaron con PBS 1X y se transfirieron a un tubo cónico de 15 mL, éstas se centrifugaron a 2.06 rfc por 10 minutos a temperatura ambiente (~25°C) y el sobrenadante (SN1) se desechó, mientras que el botón (B1) se diluyó en 6 mL de PBS 1X, con el fin de obtener una buena dilución que permitiera un conteo celular adecuado, como se muestra en la siguiente tabla;

Tabla 3. Conteo celular de la cosecha del cultivo de las células MDA-MB-231

**Conteo de los cuatro cuadrantes secundarios en Hemocitómetro
(Cada cuadrante contiene 16 recuadros de 0.1 mm³)**

1.	Conteo en cuadrantes: 1) 175, 164, 145 y 136 células 2) 126, 176, 116, 149 células
2.	Promedio conteo cuadrantes: 1) $620/4 = 155$ células / 0.1 mm ³
3.	Corrección de la dilución azul de tripán (1:1): 1) $155 (2) = 310$ células / 0.1 mm ³
4.	Se lleva a cantidad por células por mililitro (cm ³) multiplicando por 10 ⁴ : 1) 3, 100, 000 células / mL
5.	Se calcula el número total de células en la suspensión del botón celular. En este caso como se resuspendió en 6 mL de PBS, el cálculo es el siguiente: 13, 100, 000 (6) = Conteo 1. 18, 600, 000 células totales Conteo 2. 17, 010, 000 células totales Promedio: 17,805,000 (1.7 x 10⁶) células totales (DE): ± 1,124,299.78

Se muestra el procedimiento de conteo para la obtención del número total de células obtenidas a partir del cultivo de 6 cajas con confluencia mayor al 80 % y de las cuales se continuó con el proceso de ChIP. Tomado de: Guía de TP No.2:

Mantenimiento de líneas celulares, Universidad Nacional de Quilmes, 2014.

Dicho conteo se realizó a partir de 10µL de la dilución, en donde el número de células recolectadas fue de 1.7×10^6 células totales.

Una vez determinado el número de células, la muestra con células completas se centrifugó a 2.06 rfc por 5 minutos (25°C). El sobrenadante (**SN2**) se desechó y el botón obtenido (**B2**), se resuspendió en 1 mL de PBS 1X más 10 µL de PMSF (*fluoruro de fenilmetilsulfonilo*, [10 mM]). Para retirar el exceso de PMSF, la muestra se centrifugó por 5 minutos a 2.2 rfc (~25°C); se desechó el sobrenadante (**SN3**) y el botón celular (**B3**) se incubó 10 min (4°C) en presencia de 900 µL de Buffer de Lisis Celular ChIP (Ver composición en Apéndice I), y 10% de Antiproteolíticos (v/v) (Roche®). Una vez finalizada la lisis celular, la muestra, ahora con células rotas y núcleos intactos, se mezcló suavemente por inversión y pipeteo, y se centrifugó a 8.6 rfc por 5 minutos a 4°C para sedimentar los núcleos: y obtener así la fracción nuclear (**FN; B4**). El sobrenadante de esta última centrifugación (**SN4**) se conservó como fracción citoplasmática (**FC**), la cual se empleó posteriormente como control negativo en la inmunoprecipitación, (Ver sección 5.3. Inmunoprecipitación de cromatina, ChIP). A la (**FN**), se le agregaron 200 µL de Buffer de Lisis Nuclear ChIP (Ver composición en Apéndice I), y Antiproteolíticos al 10% (v/v) (Roche®); se incubó por 10 minutos a 4°C para obtener la cromatina total de las células MDA-MB-231.

Tras la obtención de ambas fracciones, citoplasmática y nuclear, a éstas se les determinó la concentración de DNA espectrofotométricamente (260 nm), (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific). Además de la concentración de DNA, el espectrofotómetro permitió determinar la pureza del DNA obtenido y contaminantes como proteínas (280 nm), componentes orgánicos y/o sales (230 nm). Cuando se purifica DNA para realizar ensayos de PCR o secuenciación, los coeficientes de la relación de pureza a 260/280 y 260/230 nm tienen que tener un valor máximo de 1.8 y 2, respectivamente. En nuestro caso, debido a que se mantuvieron las uniones DNA-proteína, el valor a 280 nm lo esperamos menor a 1.8.

La presencia de DNA se corroboró mediante un corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1%, a partir de 100 ng de DNA totales; así como se corroboró su ausencia en el control negativo (FC). La electroforesis se corrió a 90 V durante 1 hora, en presencia de Buffer TBE 0.5 X.

Finalmente, la concentración de proteínas totales en las muestras, se determinó (por triplicado) por el método de Bradford (Giraldo G, et al, 2010).

4. Primera digestión del DNA

Con el fin de optimizar la unión del anticuerpo primario -anti-BIK- con su epítipo, el primer paso de la técnica de ChIP implicó la generación de fragmentos con un tamaño de 200 a 1000 pb del DNA (cromatina de las células MDA-MB-231). La estandarización de esta primera digestión, se realizó con cromatina de leucocitos –obtenidos a partir de sangre periférica-, y en presencia de la endonucleasa micrococcal (MNasa; Thermo Scientific). Dentro de las condiciones modificadas para la estandarización, se manejaron condiciones fijas de tiempo (10 minutos), temperatura de reacción (37°C); mientras que se modificaron las condiciones de unidades enzimáticas (de 0.5 a 100 U), concentración de DNA (446-892 μL) y el volumen final de reacción (20-25 μL). Con el fin de obtener un barrido de fragmentos concentrados entre 200-1000 pb.

Teniendo como punto de partida las condiciones obtenidas de la estandarización en leucocitos, el corte óptimo del DNA de las células MDA-MB-231 se realizó con una concentración de 0.8 U de enzima, ~1424 ng de DNA, 4 μL de Buffer de Reacción 10 X, y 34.2 μL de agua libre de endonucleasas, por reacción (40 μL finales). La muestra se incubó por 10 minutos a 37°C en un termociclador (Corbett, Life Science). Para inhibir la reacción, se agregaron 0.25 mM de EGTA. Debido al gran volumen de la muestra de DNA a digerir obtenido de las células (~295 μL), se realizaron reacciones triples por cada tubo de 200 μL , realizando un total de 30 reacciones obteniendo un volumen total de cromatina fragmentada de 144 μL .

La especificidad de la reacción de digestión del DNA, se determinó al incubar el DNA bajo las mismas condiciones de reacción, pero en ausencia de la MNasa. Para confirmar el rango de fragmentación del DNA en cada reacción, el producto de digestión se corrió en un gel de agarosa al 3% en presencia de Buffer TBE 0.5 X. Una vez que se confirmó que todos los productos de digestión tenían el mismo rango de fragmentación, éstos se colectaron en tubos de 1.5 mL y se guardaron a -20°C hasta que se llevaron a cabo los ensayos de inmunoprecipitación.

5. Inmunoprecipitación de BIK

La descripción general del procedimiento de la ChIP se observa en la **Figura 15**:

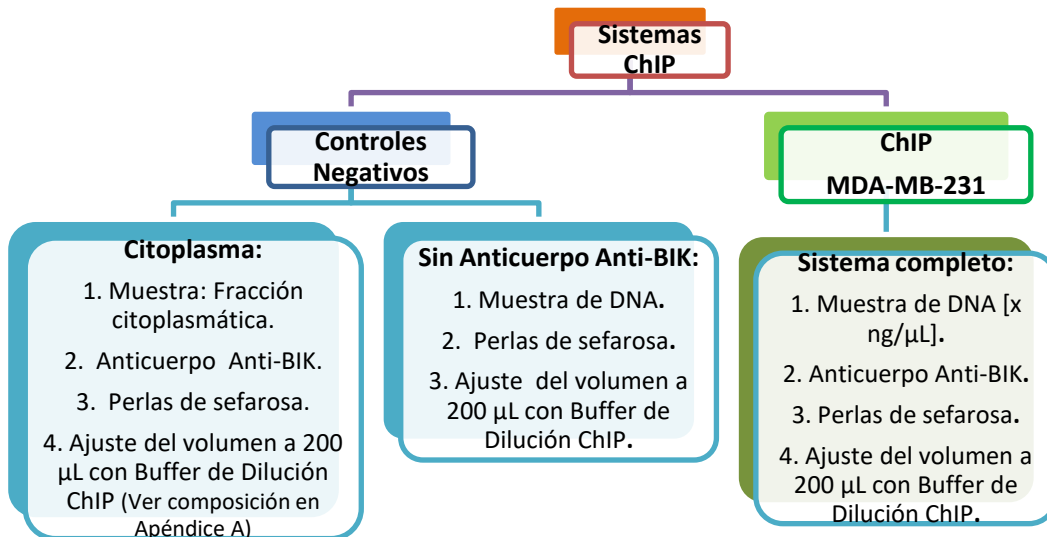


Figura 15. Procedimiento de Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), a partir de las células MDA-MB-231

6. Eliminación de señales inespecíficas en la muestra de cromatina –MDA-MB-231: “Pre-clearing del DNA”

Una vez que se obtuvieron los fragmentos del tamaño adecuado (200-1000 pb) para iniciar la inmunoprecipitación (IP), se eliminó el material inespecífico en la cromatina. Para ello, la muestra (con 500 ng de DNA y 193 μ g de proteínas totales) se incubó por 2 h a 4°C en presencia de 10 μ L de perlas de sefarosa acopladas a las proteínas A y G (Santa Cruz, Biotechnology, *sc-3000*), en un volumen final de 1,410 μ L. Es importante mencionar, que con este mismo proceso de limpieza, se trataron los 3 sistemas mencionados en la **Fig. 15**. El volumen de los controles negativos “Citoplasma” y “Sin anti-BIK” se ajustó con Buffer de dilución ChIP (**Ver composición en el Apéndice I**).

7. Inmunoprecipitación de la proteína BIK

Una vez terminado el proceso de “Pre-clearing”, las muestras se centrifugaron a 2.23 rfc por 3 minutos a 4°C. Los sobrenadantes de cada sistema (**SN1**) sin señal inespecífica, se transfirieron a tubos nuevos de 1.5 mL tratando de no traer ninguna perla durante el proceso; los botones resultantes (**B1; perlas**) se desecharon.

Al **SN1** de cada sistema se le agregaron 4 µg de anticuerpo primario Anti-BIK (Abcam[®], IgG *ab52182*), excepto en el caso del control negativo sin anticuerpo primario. El volumen final de todos los sistemas se ajustó a 200 µL con el Buffer de Elución ChIP (**Ver composición en Apéndice I**), para favorecer la unión específica perla-anticuerpo-BIK-DNA. Las muestras se incubaron en agitación constante (4°C) durante una noche (~15 h).

Al día siguiente, a cada sistema se le agregaron 20 µL de perlas y se incubaron en agitación constante durante 2 horas a 4°C. Finalizado el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron a 2.23 rfc por 3 minutos a 4°C y los sobrenadantes resultantes (**SN2**), se transfirieron a tubos nuevos: fracciones “**Unbound**” (**U**); es decir, regiones genómicas y proteínas asociadas, entre otros componentes celulares, que no establecieron interacciones directas (inmunoprecipitaron) con BIK.

Con el fin de eliminar el posible ruido de fondo (inespecificidad), en el **complejo perla-anticuerpo primario-BIK-DNA**, los botones de cada sistema (**B2; perlas**) se lavaron con 1 mL de los siguientes Buffers para ChIP en orden consecutivo: 2X Low Salt Wash Buffer; 2X High Salt Wash Buffer; 1X LiCl Wash Buffer y 2X TE Buffer (**Ver la composición de los Buffers de Lavado ChIP en el Apéndice I**). Entre cada lavado, los sistemas se centrifugaron a 6.88 rfc durante 4 min a ~25°C.

7.1. Reversión del entrecruzamiento DNA-Proteína (“Cross-linking”)

Para la reversión del “cross-linking” del **complejo perla•anticuerpo primario•BIK•DNA**, a las muestras se les agregaron 250 µL de Buffer de Reversión del “Crosslinking” ChIP (preparado en fresco; **ver composición en Apéndice I**) y se incubaron en agitación constante durante 10 minutos a 65°C. Después, las muestras se centrifugaron a 6.88 rfc por 4 minutos a temperatura ambiente

(~25°C). Los sobrenadantes (**SN-DNA1a a SN-DNA4a**) se transfirieron a tubos nuevos, y se mantuvieron a 4°C. Con el objetivo de recuperar la mayor cantidad posible de DNA después de la inmunoprecipitación, a las perlas restantes (**B1-B4**) se les realizó una segunda extracción de DNA con Buffer de Reversión de “Crosslinking”. Los sobrenadantes (**SN-DNAb-SN-DNAb**) resultantes se juntaron con los sobrenadantes (**SN-DNA1a, a: SN-DNA4a**) obtenidos en la extracción anterior. Finalmente, la reversión se completó al incubar los sobrenadantes en agitación constante durante una noche (~14 h) a 65°C.

7.2. Purificación de DNA

Al día siguiente de la reversión del “cross-linking”, las muestras se retiraron del horno y se comenzó con la purificación del DNA por el método de fenol-cloroformo-isoamílico (Green M y Sambrook J, 2012). A cada sistema se le agregaron 500 µL de fenol-cloroformo-isoamílico (24:23:1 (v/v)), se agitaron vigorosamente de forma manual por 1 minuto aproximadamente y se centrifugaron a 17.2 rfc por 5 minutos a temperatura ambiente (~25°C).

Terminada la centrifugación, se tomó la fase orgánica (DNA) y con cuidado de no tocar la interfase, que contiene las proteínas, se transfirió a un nuevo tubo de 1.5 mL. A esta fase se le agregaron 500 µL de cloroformo-isoamílico (23:1 (v/v)), se agitó firmemente por inversión durante aproximadamente 1 minuto y se centrifugó a 17.2 rfc por 5 minutos (~25°C). Con las fases orgánica y acuosa de nuevo separadas, se tomó la fase acuosa (DNA) y se transfirió a otro tubo nuevo de 1.5 mL, y se le agregaron 1.5 mL de etanol absoluto grado molecular (Merk®), 50 µL de NaCl 5M y 4 µg de glucógeno grado molecular (Roche®). Posteriormente, las muestras se mezclaron por inversión y se dejó precipitar el DNA a -20°C durante 48 horas. Transcurrido el tiempo de precipitación, las muestras se centrifugaron a 24.08 rfc por 15 minutos (~25°C) y el SN se retiró con sumo cuidado de no tocar el botón -color grisáceo- que contiene el DNA precipitado.

El botón se dejó secar, invirtiendo el tubo abierto sobre una hoja de papel absorbente durante aproximadamente 1 minuto, y se resuspendió en 20 µL de agua libre de nucleasas. La concentración de DNA de todas las muestras, una vez bien homogeneizadas, se determinó espectrofotométricamente (260 nm; Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific®).

8. Amplificación del DNA (KIT de amplificación del Genoma Completo)

Para la amplificación del DNA obtenido de la inmunoprecipitación, se utilizó el Kit de amplificación del genoma completo **WGA (Whole Genome Amplification; Sigma Aldrich®)**. El uso de este Kit requiere de una concentración inicial de 1 ng/μL de DNA, a partir del cual se obtendrían >10 μg de DNA, según datos del fabricante. La amplificación del DNA genómico con este Kit, consta de tres pasos: Fragmentación, Preparación de la librería y Amplificación.

8.1. Fragmentación

Primero, se realizó una dilución de la muestra para tener una concentración final de 1.4 ng/μL, comenzando la reacción con 10 μL de esta dilución, a la cual se le agregaron 10 μL del Buffer de Fragmentación (10 X). Posteriormente, la muestra se agitó para homogeneizarla, se microcentrifugó y se incubó en un termociclador (Corbett) bajo las siguientes condiciones:

Tabla 4. Fragmentación de DNA amplificado con Kit WGA

Temperatura	Tiempo
95°C	4 minutos (Exactos)

Una vez terminado el tiempo de incubación, la muestra se enfrió inmediatamente en hielo y se eliminó la condensación por microcentrifugación, y se procedió con la preparación de la librería de DNA.

8.2. Preparación de la librería

Al producto de la reacción anterior, se le agregaron 2 μL de Buffer de Preparación de la Librería (1X) y 1 μL de Solución Estabilizadora de la Librería. La muestra se mezcló en un vortex por unos segundos y se microcentrifugó. Posteriormente, la muestra se incubó bajo las siguientes condiciones:

Tabla 5. Primera etapa: preparación de la librería de DNA

Temperatura	Tiempo
95°C	2 minutos

A continuación, la muestra se enfrió en hielo, se microcentrifugó y se mantuvo a 4°C, hasta el momento de agregar 1 µL de la Enzima de Preparación de la Librería (1X). La muestra se homogeneizó en vórtex y se microcentrifugó (~2 segundos), y se incubó bajo las siguientes condiciones:

Tabla 6. Segunda etapa: preparación de librería de DNA

Temperatura	Tiempo
16°C	20 minutos
24°C	20 minutos
37°C	20 minutos
75°C	5 minutos
4°C	Enfriamiento

Al finalizar la reacción, la muestra se microcentrifugó (2 seg) y se procedió con la tercera etapa (amplificación). Cabe mencionar, que algunas reacciones se almacenaron a -20°C antes de proceder con la etapa de amplificación; sin embargo, ninguna de ellas mostró alguna diferencia en el rendimiento final de la amplificación.

8.3. Amplificación

A los 15 µL de cada reacción, obtenidos en el paso anterior, se le agregaron los siguientes reactivos:

Tabla 7. Mix para amplificación del DNA obtenido con el Kit WGA

Mix por Muestra	
Reactivo	µL por reacción
10X Master Mix de Amplificación	7.5
Agua, (Grado molecular)	47.5
DNA Polimerasa WGA	5

Las muestras se homogeneizaron en vórtex y microcentrifugaron brevemente y se incubaron bajo las siguientes condiciones:

Tabla 8. Condiciones de amplificación del DNA obtenido con el Kit WGA

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos
14 ciclos:		
Desnaturalización	94°C	15 segundos
Alineamiento/Extensión	65°C	5 minutos

Al finalizar la amplificación, la muestra se concentró en el fondo del tubo por microcentrifugación, y se almacenó a -80°C hasta su uso posterior.

8.4. Purificación del DNA amplificado

Para purificar el DNA obtenido a partir de la amplificación, se realizó una precipitación de los 75 µL del producto amplificado (109.31 µg), transfiriéndolo a un tubo nuevo de 2 mL y se le agregaron 1.5 mL de etanol absoluto grado molecular (Merck®), NaCl 5 M [Final 0.1 M] y 4 µg de glucógeno grado molecular (Roche®). Por último, la muestra se dejó precipitar a -20°C durante 48 horas, se centrifugó a 24.08 rfc y se resuspendió en 25 µL de agua libre de DNAsas. El rendimiento del DNA obtenido fue del 56.79 % respecto al DNA inicial.

9. Arreglos “Tiling” 2.0 (Affymetrix®)

El protocolo de los arreglos tipo “Tiling” (Affymetrix) para el procesamiento de los 7 chips que lo conforman, requiere de una concentración inicial de DNA amplificado y purificado de 9 µg por chip. Debido a esto, el DNA obtenido por la técnica de ChIP se ajustó a esta concentración mediante diluciones seriales, lo cual nos permitió trabajar con los 7 chips incluidos el sistema Tiling.

9.1. Segunda digestión del DNA con DNAsa I

Antes de cargar la muestra en los chips, ésta necesitó de una segunda digestión de DNA con una DNAsa tipo I (Affymetrix); esto con el fin de obtener fragmentos de DNA enriquecidos en un rango de ~60 pb.

Primero, se estandarizaron las condiciones de corte del DNA a utilizar para esta enzima con su respectivo Buffer de Reacción; para este proceso, se modificaron las unidades de enzima agregadas a la reacción (0.5 U-2.5 U) y el volumen de reacción (de 25 a 48 µL). La concentración de DNA se mantuvo constante (1 µg/µL).

Con base en la estandarización, las condiciones encontradas para fragmentar 1 µg de DNA se extrapolaron a un sistema con 9 µg. Las condiciones óptimas de reacción por sistema o arreglo (9 µg de DNA) fueron las siguientes:

Tabla 9. Condiciones óptimas de preparación para digestión del DNA con DNAsa I

Master Mix		Reacción por Sistema	
Reactivo	Volumen (µL)	Reactivo	Volumen (µL)
DNAsa I (2.25 U/µL)	1.05	Muestra DNA (9 µg)	3
Buffer de Reacción 10X	26.4	Master Mix	10
H₂O libre de Endonucleasas	20.55	H ₂ O libre de Endonucleasas	35
		Volumen Final	48

Cantidades usadas en la digestión del DNA (9 µg), obtenido con el Kit de amplificación WGA. Se realizó un Master Mix fresco por cada 2 reacciones de digestión.

Al terminar la preparación de los sistemas, se. La digestión se llevó a cabo en un termociclador (Corbett®) bajo el siguiente protocolo de fragmentación:

Tabla 10. Condiciones óptimas de reacción para digestión del DNA con DNAsa I

Temperatura	Tiempo
37°C	35 minutos
95°C	15 minutos
4°C	Espera

Al término de la reacción, los tubos se microcentrifugaron para bajar la muestra y eliminar la condensación, conservándose a -20°C hasta su uso posterior. Se llevaron a cabo digestiones para completar suficiente cantidad para cargar 7 chips con 9 µg de DNA total cada uno.

9.2. Marcaje DNA

Posterior a la digestión, el marcaje del DNA se realizó con el Reactivo de Marcaje de DNA DLR (*DNA Labeling Reagent*, Affymetrix). Para dicho marcaje, se tomaron 45 µL del producto de digestión obtenido con la DNAsaI y se llevaron a tubos nuevos. Posteriormente, se preparó un Master Mix con los siguientes reactivos:

Tabla 11. Condiciones de reacción para preparación de la mezcla para el marcaje del DNA fragmentado con la DNAsa I

Reactivo	Master Mix (µL)
5X Buffer de Reacción de la Deoxinucleotidil Transferasa Terminal (<i>TdT</i>)	88.2
Deoxinucleotidil Transferasa Terminal Recombinante (rTdT) (30U/ µL)	14.7
DLR 10mM	7.35
Volumen Final	110.25

Reactivos utilizados para preparar el Master Mix de marcaje del DNA fragmentado (9 µg) con la DNAsaI. Se preparó el volumen necesario para las 7 reacciones (771.75 µL), con un exceso del 5%; se agregaron 15 µL del Master Mix a cada sistema.

Tras vortexear y dar un breve spin a cada tubo, se realizó la reacción de marcaje en un termociclador bajo las siguientes condiciones:

Tabla 12. Condiciones temperatura para reacción de marcaje del DNA fragmentado con la DNAsa I

Temperatura	Tiempo
37°C	60 minutos
70°C	10 minutos
4°C	Mínimo 2 minutos

9.3. Hibridación, Lavado y Escaneo

Al término de la reacción de marcaje, se tomaron los 60 µL del producto de reacción anterior y se pasaron a tubos nuevos. Posteriormente, se preparó la mezcla de hibridación “Master Mix”:

Tabla 13. Condiciones óptimas para hibridación del DNA

Master Mix		Reacción por Sistema	
Reactivo	Volumen (µL)	Reactivo	Volumen (µL)
Oligonucleótido Control B2	28	DNA Marcado (~9 µg)	60
Mix de Hibridación 2X	840	Master Mix	140.8
Dimetil sulfóxido (DMSO)	117.6	H ₂ O libre de Endonucleasas	39.2
Volumen Final	985.6	Volumen Final	240

Se muestran los volúmenes utilizados para la reacción de hibridación del DNA marcado en la reacción anterior; los volúmenes señalados corresponden a los 7 sistemas trabajados.

Una vez que se prepararon las reacciones de hibridación, éstas se incubaron en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

Tabla 14. Condiciones de reacción para hibridación de DNA

Temperatura	Tiempo
99°C	5 minutos
45°C	5 minutos
Microcentrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto	

Antes de cargarse los chips, éstos se dejaron atemperar por 10 minutos y se cargaron 200 µL en cada chip, de los 240 µL totales obtenidos de la hibridación de DNA.

Una vez que el horno de hibridación (GeneChip® Hybridation Oven 640), alcanzó los 45°C y 60 rpm, los chips se colocaron en la canastilla del horno y se dejaron hibridar a 45°C por 18 horas. Posteriormente, las muestras se retiraron y se cargaron con 200 µL de la mezcla de hibridación. Para el proceso de lavado, éste se realizó en la estación de lavado (GeneChip® Fluidics Station 450), bajo el protocolo lavado: PRIME 450.

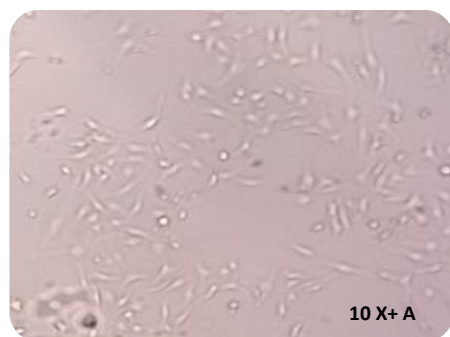
Finalmente, los chips se escanearon (GeneChip® Scanner 3000 7G), y se obtuvieron los datos en formato .CEL; estos datos se emplearon más tarde para el análisis de los resultados.

IX. RESULTADOS

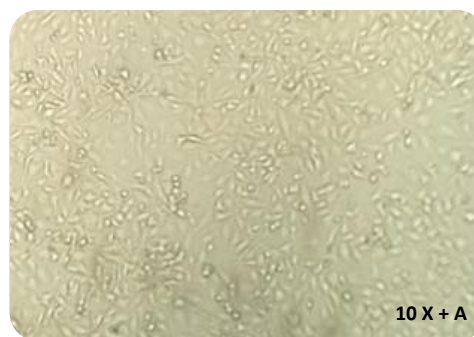
1. Cultivo de la línea celular MDA-MB-231

Las células MDA-MB-231, se crecieron bajo las condiciones antes mencionadas (**Ver apartado 1. Cultivo Celular, Metodología**). Dicho procedimiento se siguió hasta alcanzar una confluencia mayor al 95%. Una vez que se llevó a cabo el procedimiento de fijación de las células (formaldehído al 1%), se realizó la cosecha celular de 6 cajas de cultivo con confluencia mayor al 95%, de las cuales se obtuvieron 1.7×10^6 células. Éstas se centrifugaron a 228 rfc para obtener el botón total de células MDA-MB-231 y se cuantificaron (**Ver apartado 3. Obtención de cromatina, Metodología**).

En las siguientes figuras se presentan algunas imágenes que representan el proceso de siembra, crecimiento y conteo de las células MDA-MB-231.



A) A las 72 h posteriores al descongelamiento.



B) Previo a realizar un pase para continuar la proliferación celular

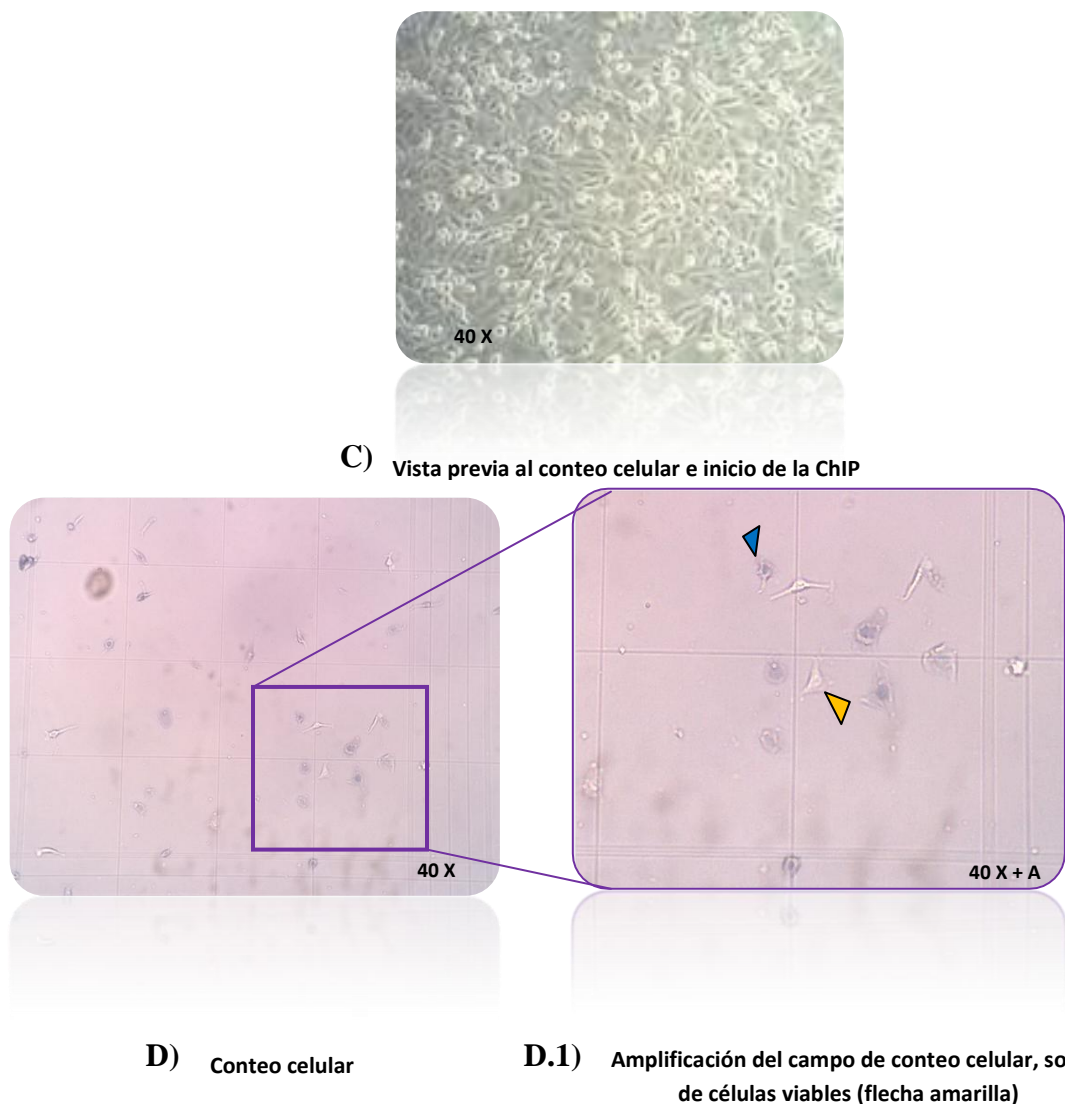


Figura 16. Imágenes del cultivo de las células MDA-MB-231

Imágenes obtenidas con un microscopio invertido (Leica®), durante el cultivo de la línea celular MDA-MB-231. **(A)** Imagen tomada durante la primera siembra del cultivo celular, posterior al descongelamiento del criotubo. **(B)** Imagen tomada del cultivo de la línea celular de un día y caja diferente a la imagen anterior, en donde se observa una confluencia mayor al 80 %, bajo un aumento de 10X. **(C)** Imagen tomada de una de las 6 cajas de cultivo con una confluencia mayor al 95%; 40 X **(D)** Imagen tomada durante el conteo celular (40X), antes de comenzar con la extracción de cromatina, dilución 1:1 con el colorante azul de tripan 0.4%; **(D.1)** Aumento de la imagen anterior. La flecha azul representa una célula no viable, con colorante en su interior; mientras que la flecha amarilla representa a una célula viable. Cabe mencionar que sólo se tomaron en cuenta estas últimas para el conteo de células totales.

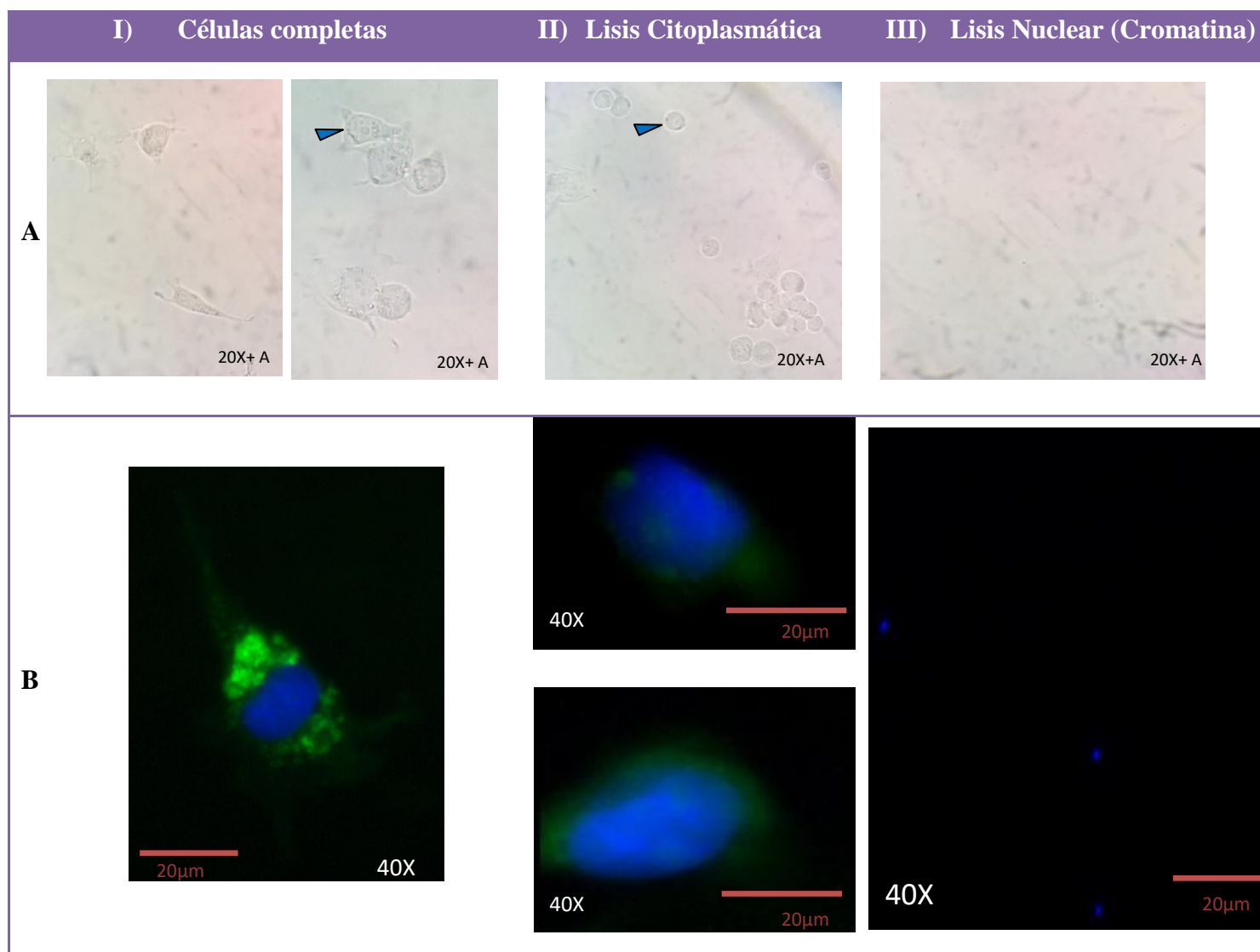
2. Obtención de cromatina de células MDA-MB-231

Una vez que se extrajeron y contaron las células MDA-MB-231 (1.7×10^6 células), se procedió con las lisis selectivas para la extracción de cromatina; para confirmar la lisis celular y la nuclear, se verificó la presencia de células completas y de núcleos en un microscopio óptico. Asimismo, la presencia de núcleos y la obtención de cromatina se verificaron por microscopía de fluorescencia al teñir las células totales, y las fracciones: nuclear y la cromatina libre. La tinción se realizó con el colorante selectivo de material genético DAPI.

Nuestros resultados revelaron que la lisis celular con los buffers para ChIP fue selectiva, ya que las células completas mostraban una morfología definida (**Fig. 15-I-A**), la cual se perdió al lisar las células, quedando un gran número de núcleos intactos (**Fig. 15-II-A**); Por otro lado, la lisis nuclear liberó de manera adecuada la cromatina (**Fig. 15-III-A**).

Por su parte, la microscopía de fluorescencia confirmó las observaciones anteriores: Antes de la lisis celular, se observó una estructura celular intacta (**Fig. 15-I-B**), la cual se alteró con la primera lisis (**Fig. 15-II-B**); por último, se observó la ausencia de células completas o núcleos en la fracción que contiene la cromatina en suspensión (**Fig. 15-III-B**).

Tabla 15. Comprobación de la lisis celular y nuclear para la obtención de cromatina con los buffers de lisis ChIP



(A) Células fijadas (formaldehído 1%) vistas en campo claro a un aumento de 20 X. En el cuadrante **I**, se observan las células completas con una morfología alargada y estrellada, la cual es característica de las células MDA-MB-231. Asimismo, en algunas células, es posible distinguir los núcleos (flecha azul). En el cuadrante **II**, después de la lisis celular, se observan los núcleos celulares intactos (flecha azul). En el cuadrante **III**, posterior a la lisis nuclear (para liberar la cromatina), ya no se observa alguna estructura celular definida, solo algunos puntos teñidos de DNA que evidencian a la cromatina en suspensión. (B) Se observan de nuevo las tres fases del procedimiento en un microscopio de epifluorescencia (Axio Imager A1 Zeiss) a un aumento de 40 X. En el cuadrante **I** se observan las células completas, con una clara diferenciación entre el núcleo (teñido con DAPI) y el citoplasma (verde; sin tinción, simplemente se observa el contraste con el filtro de 560 nm). En el cuadrante **II**, la tinción con DAPI permitió visualizar la presencia de núcleos en la muestra. Interesantemente, se observa citoplasma remanente (verde) en menor intensidad aunque aún adherido a los núcleos después de la lisis celular. Finalmente, en el cuadrante **III** se observa la cromatina libre de células completas o núcleos, sólo se observan pequeños puntos azules, los cuales representan a la cromatina libre teñida con DAPI.

3. Cuantificación de la cromatina

Una vez que se obtuvo la cromatina de la fracción nuclear, ésta se cuantificó espectrofotométricamente en ambas fracciones: citoplasmática y nuclear. La concentración de cromatina obtenida en la fracción nuclear fue de 1424 ± 440.8 ng/ μ L, con una concentración total de 420.8 μ g (Tabla 16).

En el citoplasma se obtuvo una concentración teórica total de DNA de $267,226.667$ ng \pm 9.60 ng/ μ L (Tabla 16); sin embargo, al correr la muestra en un gel de agarosa no se observó ninguna señal de DNA en la fracción (Fig. 18). Además de observarse una concentración prácticamente nula de proteínas totales por el método de Bradford (Fernández Reyes E y Galván Cejudo A, 2014) (Tabla 17).

La diferencia entre la presencia de DNA y proteínas entre ambas fracciones, también es visible en los gráficos de cuantificación espectrofotométrica, al observar una mayor contaminación de sales en la fracción nuclear (Fig. 17-A), y una mayor contaminación de proteínas en la fracción citoplasmática (Fig. 17-B).

Tabla 16. Cuantificación de la concentración de DNA en las fracciones celulares de núcleo y citoplasma

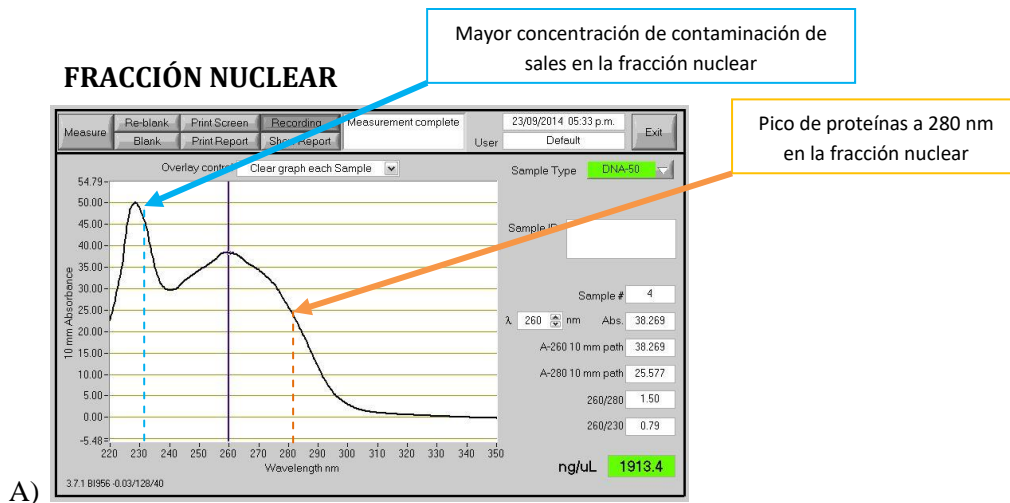
Cuantificación	Núcleo			Citoplasma		
	[ng/ μ L]	260/280	260/230	[ng/ μ L]	260/280	260/230
1	1057.9	1.42	0.59	253.9	0.45	143.72
2	1913.4	1.50	0.79	236.0	0.46	21.50
3	1300.7	1.44	0.65	238.9	0.46	20.44
Promedio	1424			342.93		
DE	± 440.87			± 9.60		
Total (295 μL)	420,080 ng	Total (1100 μL)		377,223 ng		
	420.80 μ g			377.223 μ g		

Los valores de la cuantificación de DNA en ambas fracciones revelaron que la metodología de ChIP para obtención de cromatina funcionó adecuadamente.

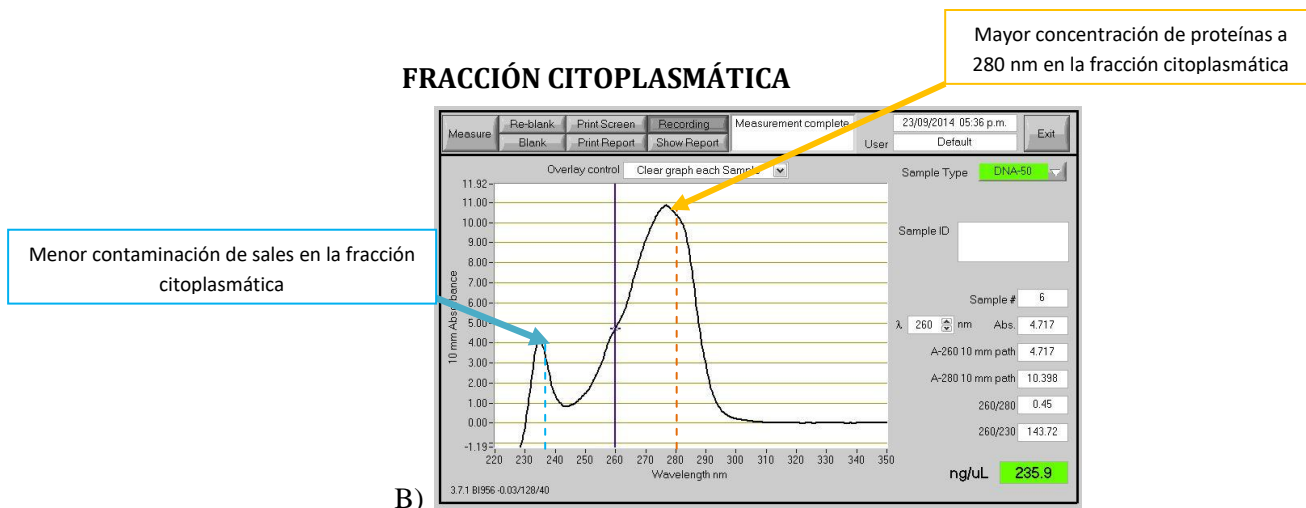
Tabla 17. Cuantificación de la concentración de proteínas totales en las fracciones celulares de núcleo y citoplasma por el método de Bradford

Núcleo			Citoplasma		
Cuantificación	[$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	DO	Cuantificación	[$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	DO
1	1.204	0.120	1	0.106	0.011
2	1.450	0.145	2	0.150	0.15
3	1.714	0.171	3	0.185	0.19
Promedio	1.456		Promedio	0.147	
DE	± 0.255		DE	± 0	
Total (295 μL)	429.52 μg		Total (1100 μL)	161.7 μg	

Los valores de la cuantificación de proteínas totales en ambas fracciones, revelaron que la metodología de ChIP, para la obtención conjunta de cromatina y de proteínas asociadas funcionó adecuadamente. Se observó además que no fue posible cuantificar proteínas totales en la fracción citoplasmática, en comparación con las encontradas en el núcleo.



A)



B)

Figura 17. Diferencia de la proporción DNA-proteína en la fracción nuclear y citoplasmática de las células MDA-MB-231

(A) La fracción de cromatina (antes fracción nuclear), se observa la presencia de un pico considerablemente más elevado en 230 nm (contaminación por sales), en comparación con el observado a 280 nm (proteínas), y uno más entre ellos en 260 nm (DNA). (B) Caso contrario a lo que se observa en la gráfica de la fracción citoplasmática, en donde la tendencia por tamaño se invierte, comenzando con el pico en 280 nm (proteínas), seguido por el de 260 nm (DNA) y finalmente el de 230 nm (contaminación por sales).

4. Visualización del DNA las células MDA-MB-231 en geles de agarosa

Para verificar la presencia de cromatina en la fracción nuclear y la ausencia de la misma en la fracción citoplasmática (condición óptima para usarse como futuro control negativo en la inmunoprecipitación), se corrieron las fracciones: nuclear y citoplasmática en geles de agarosa. Los resultados mostraron señal de DNA en la fracción nuclear, y ausencia de material genético en la fracción citoplasmática:

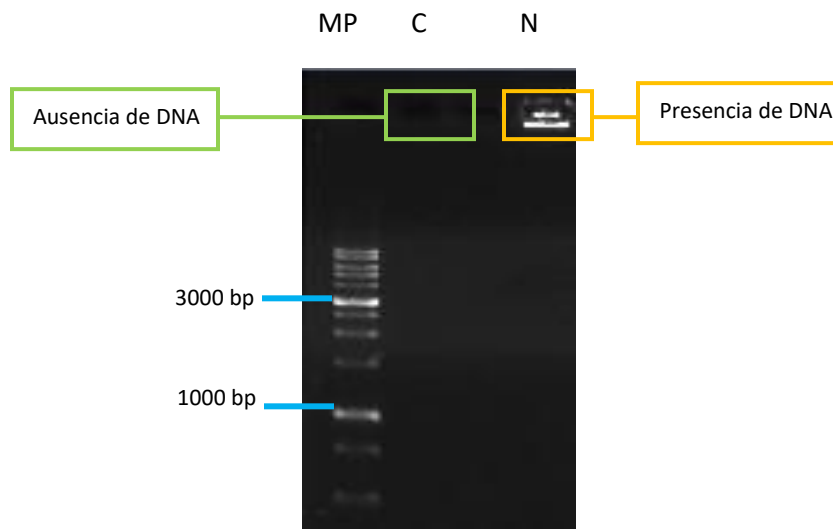


Figura 18. Visualización de la presencia de DNA en la fracción nuclear y citoplasmática de las células MDA-MB-231

El corrimiento electroforético de ambas fracciones demostró la eficiencia de la técnica para aislar cromatina. Tal como se esperaba, se observó la presencia de DNA en el carril de la fracción nuclear (N) y no se observa presencia de material genético en la fracción citoplasmática (C). El material genético se marcó con SYBR gold a una concentración final de 1X. Se cargaron 100 ng del DNA en la fracción nuclear y el volumen correspondiente a esa concentración de la fracción citoplasmática; como se puede observar en el gel, no hay presencia de DNA en esta fracción.

5. Digestión I de la cromatina obtenida por ChIP, con la Endonucleasa Micrococcal

Con el fin de obtener fragmentos de entre 200 a 1000 pb del DNA fijado a sus proteínas asociadas, se siguió el procedimiento que se describe en el Apartado 4 de Metodología.

Las condiciones que se probaron para optimizar la digestión; fueron: 1) Aumentar el volumen de reacción de 30 a 45 μ L, y 2) Una variación de la concentración de la enzima en el sistema de 0.5, 0.8 y 1U, (en la última etapa del ajuste de condiciones):

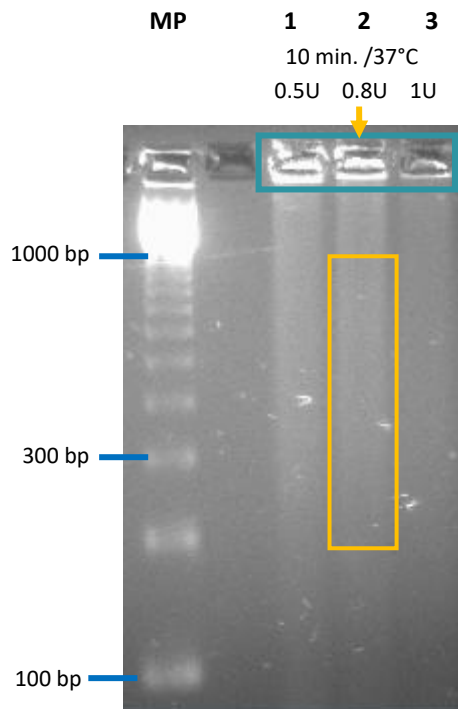


Figura 19. Condiciones representativas de la estandarización de digestión de DNA con endonucleasa micrococcal

En el primer carril, se observa como referencia del marcador de peso molecular (MP) y las condiciones finales probadas en la estandarización. Las condiciones finales fueron 3: En el carril (1), con la mayor concentración de unidades, se observa un barrido con fragmentos muy pequeños, de menos de 100 pb a más de 1000 pb. En el carril (2), condición óptima (flecha amarilla), los fragmentos más pequeños se encuentran concentrados a partir de las 200 pb (cuadrante amarillo) y con una menor concentración de DNA sin digerir remanente en el pocito a comparación de la condición 1 (cuadrante azul). Finalmente, en el carril (3) con la concentración más baja de enzima se observa que los fragmentos más pequeños se concentran a partir de los 300 pb. Las tres condiciones mostradas, se realizaron bajo las condiciones ideales encontradas en la estandarización (10 minutos a 37°C, con una concentración constante de DNA de 1,424 ng). El análisis de densidades dadas en IDV (Integrated Density Value) por el programa AlphaEasy FC 4.0 para la cantidad de DNA sin digerir remanente en el pocito (cuadrante azul) de las 3 condiciones reflejadas en porcentaje, fueron de 80.8, 77.3 y 72.8 % respectivamente; el mismo análisis para la aproximación de material genético por debajo de las 100 pb refleja un 8.1, 7.8 y 7.7 % respectivamente para las 3 condiciones.

Con base en esta estandarización, se determinó que las condiciones óptimas de enzima se representan en la condición 2 de la **Fig. 19 (recuadro amarillo)**: en presencia de 0.8 U enzimáticas de MNasa, ~1,424 ng de DNA, 4 µL de Buffer de Reacción 10X, y 34.2 µL de agua libre de Endonucleasas (volumen de 40 µL de reacción final); ya que se observa una menor cantidad de DNA genómico sin digerir en el pocito (77.3 %) respecto a la condición 1 y una menor cantidad de fragmentos de bajo peso (~100 pb), con un 7.8 % de intensidad en IDV. Además de que el rango de barrido de los fragmentos estuvo dentro de los límites de 200 a 1000 pb, con una buena concentración de los fragmentos digeridos, al poder ser observados claramente en el gel; efecto que se perdió casi por completo en la condición 3 con la concentración más alta de la enzima (1 U).

Aplicando las condiciones óptimas de corte se obtuvieron dos poblaciones de fragmentos: una que contiene fragmentos de menos de 100 pb (**Fig. 20, B**); y otra más grande y con los fragmentos concentrados de 200 pb a más de 1000 pb (**Fig. 20, A**)

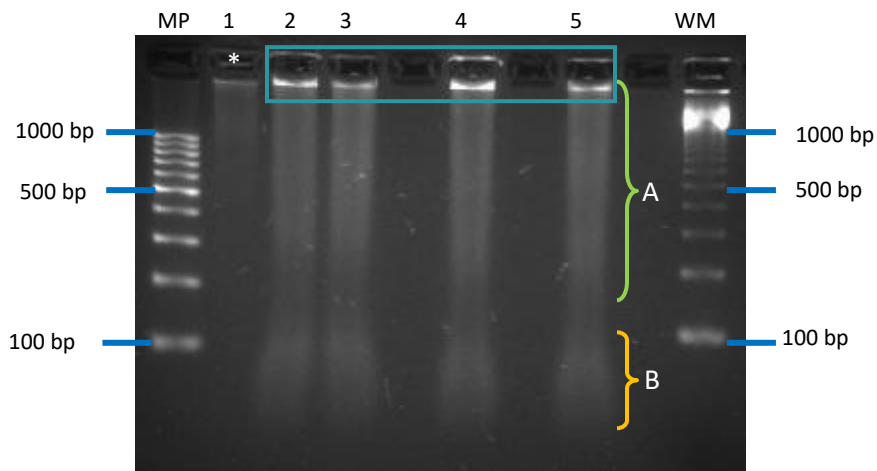


Figura 20. Digestión total del DNA obtenido de las células MDA-MB-231 con la enzima MNasa

Corrimiento electroforético en donde se observan fragmentos concentrados aproximadamente entre 150 a poco más de 1000 bp (**A, verde**) y otro concentrado menor a 100pb (**B, amarillo**). En el carril 1*, se muestra el control negativo (omitiendo el uso de enzima). En los carriles 2 a 5, se corrieron 4 digestiones escogidas al azar de entre las 30 reacciones totales que se realizaron; esto, para confirmar la homogeneidad de la reacción y un tamaño entre 200 a 1000 pb.

6. Verificación de la presencia de DNA post-digestión

Para verificar la presencia de DNA en la muestra, posterior a la digestión con la MNasa, la muestra se cuantificó de nuevo. (Tabla 18).

6.1. Cuantificación de DNA

Tabla 18. Comparación de la concentración de DNA posterior a la digestión con la Endonucleasa Micrococcal

Pre-digestión			
Cuantificación	[ng/ μ L]	260/280	260/230
1	1057.9	1.42	0.59
2	1913.4	1.50	0.79
3	1300.7	1.44	0.65
Promedio	1,424		
DE	\pm 440.87		
Total	142.4 μ g		

Post-digestión			
Cuantificación	[ng/ μ L]	260/280	260/230
1	26.3	1.49	0.59
2	25.9	1.50	0.33
3	32.6	1.57	0.44
4	33.3	1.50	0.36
5	42.4	1.46	0.43
Promedio	32.1		
DE	\pm 6.70		
Total	12.84 μ g		

Comparación de ambas cuantificaciones, donde se observa una pérdida considerable de la concentración de DNA respecto a la inicial.

7. Inmunoprecipitación

7.1. Detección de la expresión proteica de BIK en tejido de CaMa

Para estandarizar las condiciones óptimas de visualización de BIK por Western blot y confirmar posteriormente su presencia en la línea celular MDA-MB-231, se emplearon proteínas totales de leucocitos y de tejido de cáncer de mama. Estos últimos fueron utilizados como controles positivos.

Nuestros resultados indicaron que BIK se expresa en ambas muestras, con un peso molecular de aproximadamente 37 kDa en leucocitos y el tejido de CaMa. Además de una banda intensa en leucocitos con un peso de 50 kDa, que no se esperaba obtener y siempre se obtenía independientemente de las condiciones de incubación y revelado, aunque no se indagó sobre la razón de su evidencia solo en la muestra de leucocitos.

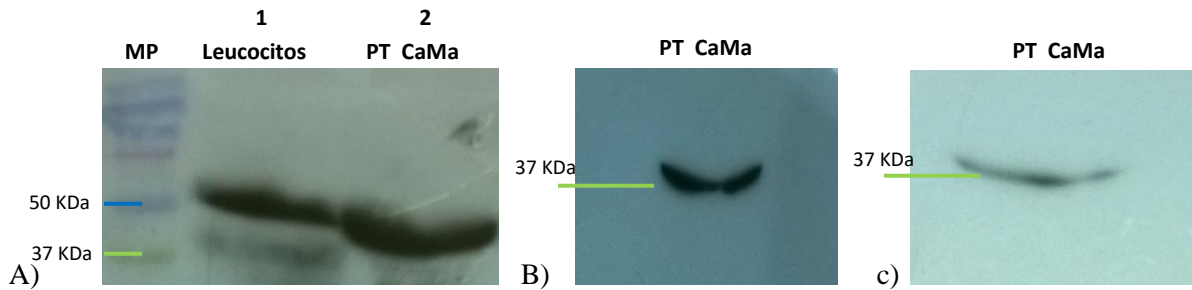


Figura 21. Determinación de la expresión proteica de BIK por Western Blot

Las tres figuras representan gels de poliacrilamida al 20%: **(A)** Se cargaron 100 µg de proteína total; **carril 1:** proteínas totales de leucocitos; **carril 2:** proteínas totales de tejido de CaMa. (placa obtenida a la hora y treinta minutos de exposición). En leucocitos, el peso señalado por el marcador es de ~50 Da y 37 kDa, mientras que en el de cáncer de mama se muestra solo en 37 kDa. **(B)** Se cargaron 240 µg de proteína total de tejido de CaMa. **(C)** Repetición del corrimiento de 240 µg de proteína total de tejido de CaMa. Placas **B)** y **C)**, obtenidas después de 30 minutos de exposición. Todas las membranas fueron incubadas con anticuerpo secundario anti-conejo 1:15,000.

7.2. Detección de la presencia de BIK por Western Blot

Debido a que no hay información que demuestre que el uso del anticuerpo primario anti-BIK (*ab52182*, Abcam®) en ensayos de inmunoprecipitación tipo ChIP, se verificó su especificidad en proteínas totales de tejido de CaMa, en base a resultados positivos en Western Blot (**Fig. 21**). Nuestros resultados también indicaron que el anticuerpo es útil para inmunoprecipitar a BIK (**Fig. 22**). El peso molecular promedio de BIK en base a tres condiciones fue de 33.3 kDa, lo cual es muy aproximado al peso esperado de ~37 kDa en base al anticuerpo utilizado. Como control positivo (Ctl +) se utilizaron las proteínas totales extraídas de tejido de CaMa y empleadas anteriormente en los ensayos de estandarización del Western blot. Para evitar el entrecruzamiento de una señal positiva al utilizar un anticuerpo secundario para revelar, se utilizó la proteína A acoplada a HRP, la cual tiene la misma función que un anticuerpo secundario pero evita las señales de falsos positivos en las muestras procesadas mediante inmunoprecipitación de cromatina.

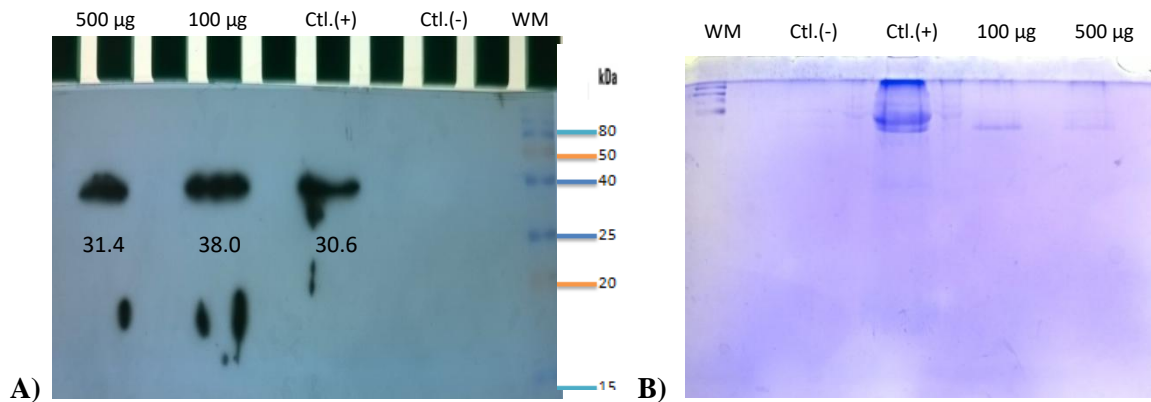


Figura 22. Inmunoprecipitación de BIK con el anticuerpo primario anti-BIK (*ab52182*)

(A) IP de BIK a partir de 100 y 500 µg de proteína total de tejido de CaMa; se emplearon 20 µL de perlas acopladas a las proteínas A/G (Santa Cruz Biotechnology) y 4 µg del anticuerpo primario anti-BIK (*ab52182*, Abcam®). Los pesos que se muestran debajo de las bandas proteicas fueron obtenidos mediante el análisis de la imagen con el programa AlphaEaseFC®. Revelado con la Proteína A acoplada a HRP como sustituto de anticuerpo secundario (usado 1:16,000) (B) Tinción con azul de Coomassie del gel de poliacrilamida al 20% en el cual se realizó el corrimiento electroforético de los sistemas para demostrar la eficiencia de la transferencia, es decir, observar si quedó proteína en el gel. Se observa un poco de proteína (bandas azul intenso) pero solo en la parte superior del gel, fuera del rango esperado en la proteína de interés.

8. Inmunoprecipitación de BIK en la cromatina de las células de MDA-MB-231

Una vez que se estandarizó la técnica de ChIP y la inmunoprecipitación de BIK, se realizó la inmunoprecipitación de BIK a partir del DNA obtenido de las células MDA-MB-231. Nuestros resultados indicaron la presencia de $3,225 \pm 9.13$ ng de DNA totales después de la inmunoprecipitación de BIK (**Tabla 19**). El valor de concentración obtenido en el tubo problema 1, se consideraron positivos al mostrar ser 4.08 y 3.11 veces mayores en la concentración de DNA, respecto a los controles negativos, sin anticuerpo y en la fracción citoplasmática respectivamente.

Tabla 19. Cuantificación de DNA obtenido de los sistemas ChIP

Sistema	Control Negativo (Sin Anticuerpo)	Control Negativo (Citoplasma)	Muestra de DNA de las células MDA-MB-231 (Sistemas problema)	
Parámetro	1	1	1	2*
Cuantificación [ng / μ L]	3.0	4.0	17.4	5.5
260/280	1.24	1.56	1.64	1.25
260/230	0.52	0.67	1.53	0.66
Promedio de concentración (ng / μL)	1.58	2.07	6.85	2.47
DE	± 1.27	± 1.72	± 9.13	± 2.64
Total	790 ng (500 μ L)	1035 ng (500 μ L)	3225 ng (500 μ L)	247 ng (100 μ L)

* La réplica de la muestra se perdió durante el proceso de reversión del “crosslinking”, de ahí los valores disminuidos en la cantidad de DNA obtenido.

Se muestran los valores obtenidos espectrofotométricamente de los sistemas ChIP, así como de los controles negativos. En los sistemas con muestra de DNA de las células MDA-MB-231, la cuantificación No. 2, representa a un duplicado. Al comparar la concentración de DNA en los sistemas, los valores obtenidos en los controles negativos: sin anticuerpo y fracción citoplasmática, mostraron contener 4.08 y 3.11 veces menor concentración de DNA respectivamente, en comparación con la concentración encontrada de DNA en los sistemas problema.

9. Amplificación del DNA genómico asociado a BIK en las células MDA-MB-231 obtenido por ChIP

Una vez que se confirmó la presencia de DNA posterior a la inmunoprecipitación de las células MDA-MB-231, se realizó la amplificación del DNA genómico obtenido con el Kit WGA (Sigma Aldrich®). Con esta amplificación, se obtuvieron $78 \mu\text{g} \pm 3.0$ a partir de la concentración inicial de 14.2 ng totales (**Tabla 23**); lo cual cumple con la especificación del fabricante que menciona la obtención de más de 10 μg a partir del material inicial de 10 ng de DNA (**Fig. 23**).

9.1 Cuantificación de DNA

Tabla 20. Amplificación del DNA asociado a BIK en las células MDA con el Kit WGA (Sigma Aldrich®)

DNA digerido con MNasa			
Cuantificación	[ng/ μL]	260/280	260/230
1	1.45	1.72	0.81
2	1.80	1.75	1.21
Promedio	1.42		
DE	± 0.03		
Total (10 μL)	14.2 ng		

DNA obtenido de la amplificación con el Kit WGA			
Cuantificación	[ng/ μL]	260/280	260/230
1	1044.5	1.48	0.89
2	1038.9	1.48	0.90
3	1039.8	1.48	0.90
Promedio	1040.8		
DE	± 3.0		
Total (70 μL)	78,060 ng		

Se muestra la concentración promedio de DNA con la que se inició la amplificación con el Kit WGA, a partir de una concentración inicial de $14.2 \text{ ng} \pm 0.03$ y el aumento posterior a la amplificación, en la cual se observa un incremento de 5,497.18 veces en la concentración de DNA respecto a la concentración inicial.

9.2. Corrimiento electroforético de la amplificación del DNA con WGA

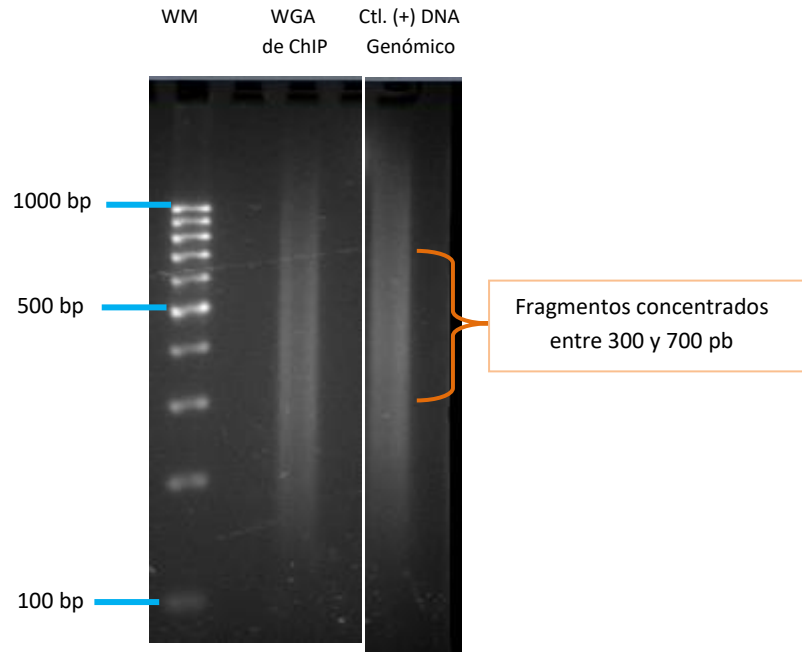


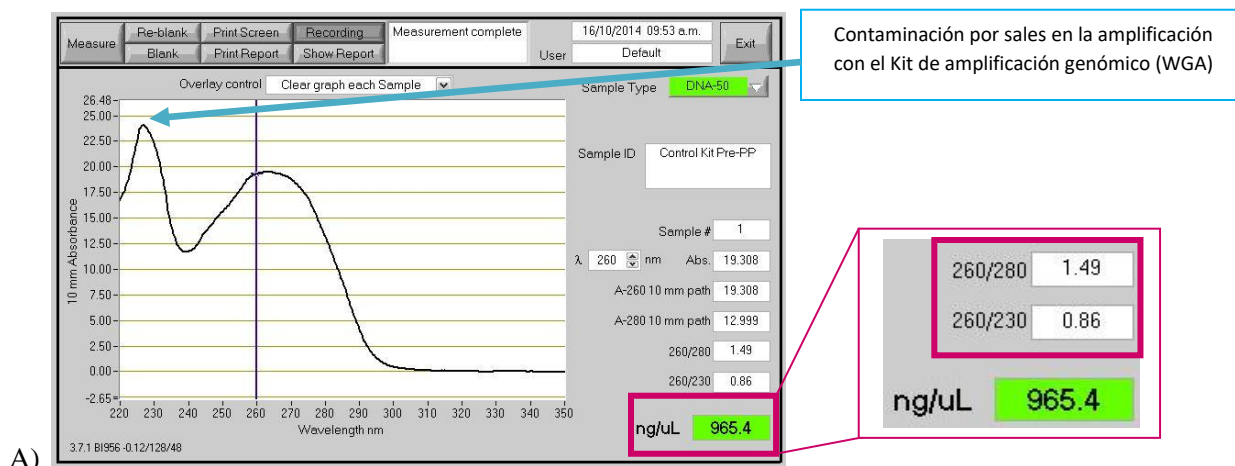
Figura 23. Amplificación del DNA asociado a BIK con el Kit (WGA)

Gel de agarosa al 3 % en donde se cargaron 100 ng de DNA de ambas muestras. Se observa que la amplificación fue similar tanto en nuestra muestra como en el control positivo (Ctl. (+) de DNA genómico (proporcionado en el Kit). El rango de los fragmentos de DNA obtenidos fue de 100 pb a 1000 pb, concentrándose entre 300 y 700 pb tal y como se menciona en el inserto correspondiente.

10. Purificación y fragmentación del DNA amplificado por el Kit WGA

Para continuar con el proceso de análisis del DNA asociado a BIK en los arreglos, era necesario tener fragmentos en un rango de ~60 pb y poseer una alta pureza en los coeficientes 260/280 y 260/230, lo más cercanos posibles a los valores de 1.8 y 2.0 respectivamente. Debido a que el DNA amplificado, tanto del control positivo como la muestra poseían una alta contaminación principalmente de sales por el Kit, observados en los coeficientes 260/280 y 260/230 tanto en el control de DNA genómico (**Fig. 24**) como para la muestra de DNA de las células MDA-MB-231 (**Fig. 25**); se procedió a purificar ambos sistemas mediante su precipitación con glucógeno, NaCl y etanol al 70% (**Métodología, 8.4**). La purificación resultó en una mejor pureza del DNA con valores en los coeficientes 260/280 de 1.8 y 260/230 de 2.1 en el control positivo (**Fig. 24**), y de 1.8 y 2.05 para la muestra (**Fig. 25**), en comparación con los valores del material inicial. Para la muestra problema, siendo que se obtuvieron 36.04 μg totales (en 25 μL), tras la purificación. Por lo tanto sabemos que se logró recuperar el 56.79 % del DNA amplificado.

DNA CONTROL PRE-PURIFICACIÓN



DNA CONTROL POST-PURIFICACIÓN

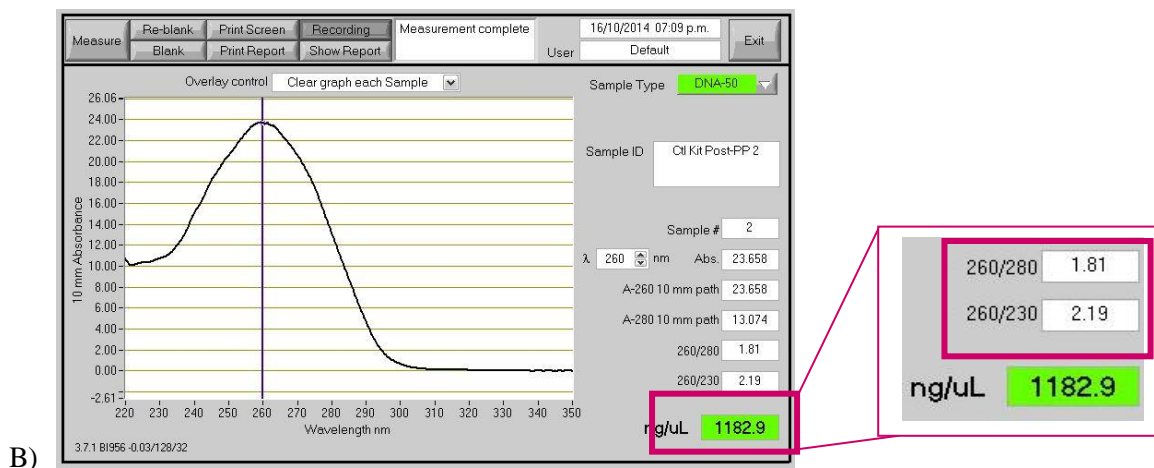
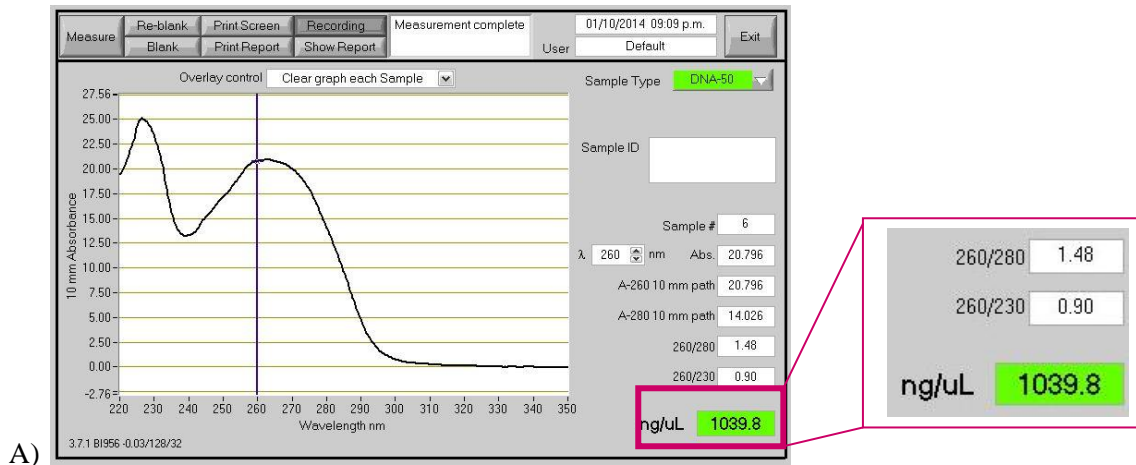


Figura 24. Eficiencia de la purificación del DNA control positivo, a partir de la amplificación con el Kit WGA

Representación gráfica de la cuantificación espectrofotométrica (Nanodrop 1000), del producto de DNA purificado (control positivo del Kit). **(A)** Cuantificación del DNA control, previo a la purificación. Se empleó una dilución 1:2 del producto amplificado solo para la cuantificación. Dicha gráfica representa una de las 3 mediciones realizadas, con un total de 12.9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de DNA (en 18 μL). **(B)** Cuantificación del producto de amplificación mediante el kit WGA posterior a la purificación (**Métodos, 8.4**), en donde la concentración fue de 6.2 μg totales de DNA (en 37 μL); con esta figura se demuestra la eficiencia de la purificación, en donde se observa la pérdida del pico de contaminación a 230 nm y la obtención de coeficientes muy cercanos a los esperados para un DNA puro: 1.8 para el coeficiente 260/280, y 2.1 para el coeficiente 260/230. Con una recuperación de DNA tras la purificación del 47.98 %.

DNA MDA-MB-231 PRE-PURIFICACIÓN



DNA MDA-MB-231 POST-PURIFICACIÓN

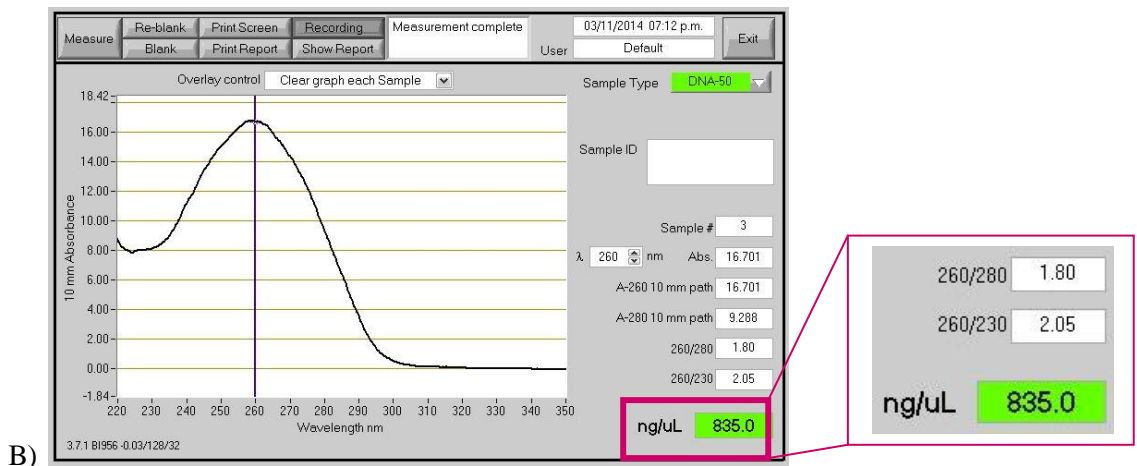


Figura 25. Eficiencia de purificación del DNA de las células MDA-MB-231 obtenido con la metodología de ChIP y amplificado con el Kit WG

Representación gráfica de la cuantificación del producto del amplificado por el kit WGA una vez purificado. **(A)** Cuantificación del DNA previo a la purificación; la cuantificación fue a partir de una dilución 1:2 del producto amplificado solo para la cuantificación. Dicha gráfica representa una de las 3 mediciones realizadas a esta muestra, de la cual el promedio de concentración de DNA fue de 66.16 μg totales en 75 μL . **(B)** Cuantificación del producto de amplificación con el kit WGA, en donde se observa la eficiencia de la purificación con la obtención de 37.5 μg totales en 25 μL ; siendo que los valores de los coeficientes son muy cercanos a los esperados para un DNA puro: 1.8 para el coeficiente 260/280 y 2.0 para el coeficiente 260/230. Con una recuperación de DNA del 56.7 %.

10.2. Estandarización de la digestión de DNA II: DNAsa I

Como requisito previo a los procesos de marcaje e hibridación del DNA, para su análisis en los arreglos de tipo Tiling, fue necesario generar fragmentos de alrededor de 60 bp para asegurar una hibridación adecuada en los chips. Para este propósito, se estandarizaron las condiciones de digestión con la DNAsa I (**Métodología, 9.1**), lográndose obtener fragmentos menores a 100 pb y concentrándose en 70 pb aproximadamente (**Fig. 26**). Los ensayos se realizaron a partir de una concentración inicial de 9 µg de DNA por chip.

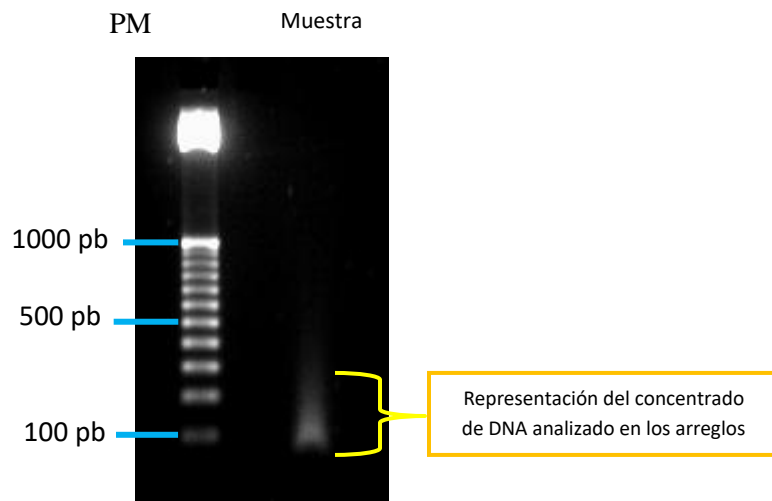


Figura 26. Fragmentación del DNA asociado a BIK

Imagen tomada con un fotodocumentador BIORAD. El producto de amplificación derivado de la CHIP de las células MDA-MB-231, el cual se amplificó, purificó y digirió con la DNAsa I, se corrió en geles de agarosa al 3 %. Se cargaron 100 ng de DNA totales.

11. Obtención de archivos formato .cel a partir del escaneo de los microarreglos

El resultado del escaneo de los siete chips bajo las instrucciones del fabricante, fueron siete archivos *.cel* (**Fig. 27**), los cuales representaron la base del análisis bioinformático del estudio junto con las bases de datos referidas para los estudios con ciertas características, como análisis tipo Tiling, en humanos, con énfasis en hibridaciones de regiones promotoras del DNA problema en los chips.

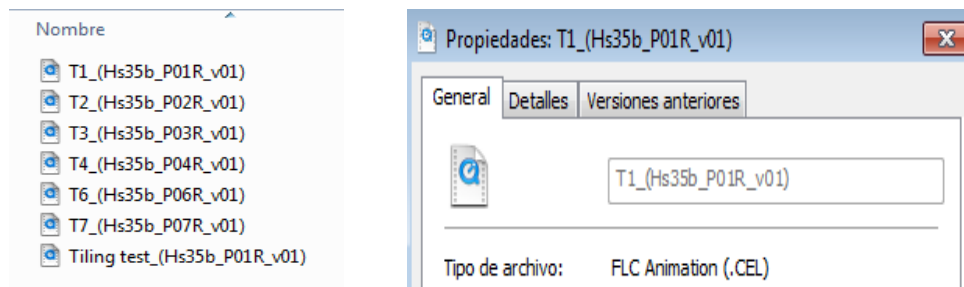


Figura 27. Formato de archivos .cel arrojados posteriormente al escaneo de los chips

Se muestran los 7 archivos *.cel* correspondientes a los 7 chips escaneados bajo el protocolo recomendado por el fabricante, los cuales fueron la materia prima de análisis para la obtención de las regiones de DNA con interacción con BIK.

12. Obtención de los sitios de unión a lo largo del genoma de las células MDA-MB-231 a los que se asocia BIK, mediante el uso del software de paquetería R-Bioconductor “Starr”

En primera instancia se evaluó la calidad de la muestra, la cual refleja una evaluación de la intensidad de la señal para cada muestra usando la paquetería R-Bioconductor “Starr”, a partir de la cual se obtienen dos gráficas que representan las intensidades de cada archivo .CEL (**Fig. 28 y 29**). Este paso ayuda a identificar aquellas muestras con un comportamiento diferente al del resto que derivan de una distribución de intensidad “normal”. En ambas figuras se observa que las muestras tienen una distribución de intensidad similar y no fue necesario remover muestras en un análisis posterior. La **Fig. 28** muestra una distribución global de las intensidades *log* o radios *log* para intensidades de prueba sin procesar a lo largo de todos los arreglos, en donde se observa una alta similitud entre todos los arreglos, indicando una alta reproducibilidad, a la vez que excluye también la presencia de factores atípicos o eventos aislados por razones técnicas o biológicas.

Boxplot for quality control of tiling array data

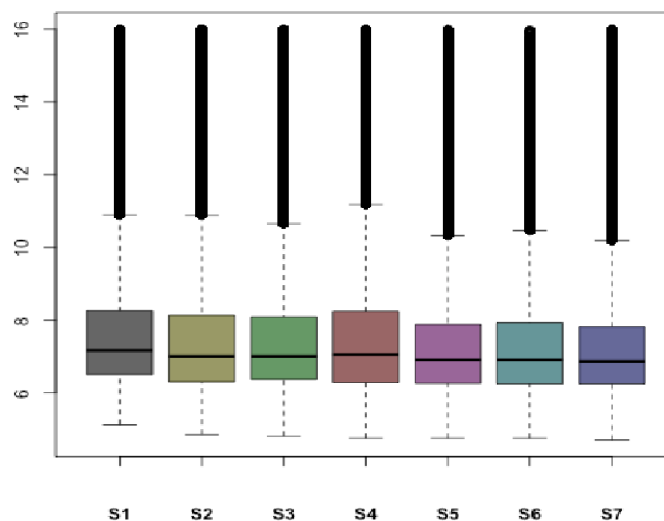


Figura 28. Boxplot del control de calidad de los datos de los arreglos Tiling

Se muestra el Boxplot de las sondas o datos crudos, representando la distribución de intensidades de muestras sin normalizar, mostrando el primer, segundo y tercer cuartiles, las barras de los valores máximos y mínimos, y la mediana representada por la línea corta en negrita dentro de la caja de cada muestra (S1 a S7 representan los nombres de las muestras, que a su vez representan los 7 chips analizados).

Los plots de densidad por otro lado, nos dan un estimado de la distribución de la señal a lo largo del chip. Cuando se detecta alguna distribución irregular en el arreglo, se recomienda removerla del análisis, ya que esta puede ser indicativo de artefactos que afectan ciertas secciones del arreglo. Sin embargo, tal y como se muestra en la **Fig. 29**, se obtuvo una distribución de intensidades de señal esperada, en donde estas fueron similares entre los arreglos individuales y no fue necesario retirar muestras de ningún arreglo.

Density plot for quality control of tiling array data

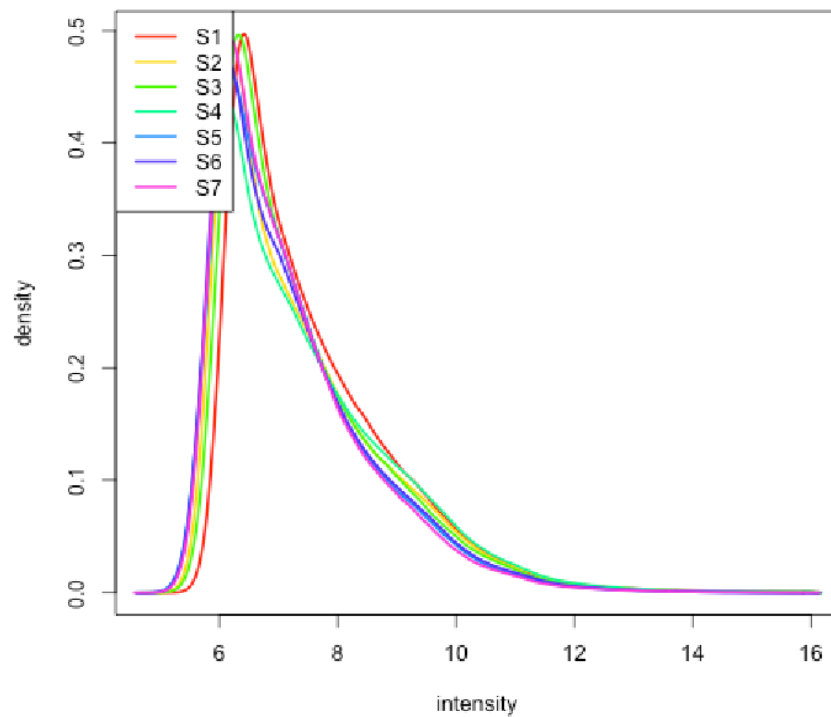


Figura 29. Plots de intensidad por arreglo

Se muestran las señales de intensidad a lo largo de los arreglos en una escala logarítmica de una prueba sin procesar, en donde ninguna sale fuera del patrón esperado por lo que no se omitió ningún dato.

13. Relación de las regiones y genes correspondientes con su descripción en ENSEMBL

A continuación se muestra una lista de genes cuyas regiones mostraron hibridación en los arreglos y contienen referencia dentro de la base de datos ENSEMBL en base al análisis de los chips por el programa bioinformático Bioconductor. De los genes enlistados se muestran de izquierda a derecha los siguientes datos: su ubicación cromosómica, los nucleótidos de inicio y término de dicho gen, el radio de discriminación de Fischer, el número de ID para el transcrito en la base de datos ENSEMBL, la descripción de la región, el número de ID del gen en la base de datos ENSEMBL y el nombre del gen asociado. En esta última columna también se señala en negritas los 13 genes asociados en base al análisis bioinformático.

Tabla 21. Genes correspondientes a la hibridación de DNA de las células MDA-MB-231 asociado a BIK y su descripción correspondiente en ENSAMB

Chr	Start.Gene	End.Gene	FDR	Ensembl. Transcript.ID	Description	Ensembl. Gene.ID	Associated. Gene.Name
chr2	198096009	198096179	0.000459	ENST00000323303	MOB family member 4, phocén [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17261]	ENSG00000115540	<u>MOB4</u>
chr2	198096009	198096179	0.000459	ENST00000409355	MOB family member 4, phoccin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17261]	ENSG00000115540	MOB4
chr2	198096009	198096179	0.000459	ENST00000409360	MOB family member 4, phoccin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17261]	ENSG00000115540	MOB4
chr2	198096009	198096179	0.000459	ENST00000409916	MOB family member 4, phoccin [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:17261]	ENSG00000115540	MOB4
chr2	42753814	42754003	0.002276	ENST00000406652	Metstasis associated I family, member 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:23784]	ENSG00000057935	<u>MTA3</u>
chr2	42753814	42754003	0.002276	ENST00000406911	Metstasis associated I family, member 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:23784]	ENSG00000057935	MTA3
chr2	42753814	42754003	0.002276	ENST00000407270	Metstasis associated I family, member 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:23784]	ENSG00000057935	MTA3
chr2	42753814	42754003	0.002276	ENST00000409019	Metstasis associated I	ENSG00000057935	MTA3

					family, member 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:23784]		
chr2	96164452	96164648	0.000459	ENST00000342380	Astacin-like metallo- endopeptidase (M12 family) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:31704]	ESNG00000188886	<u>ASTL</u>
chr5	132643073	132643277	0.00085	ENST00000265342	Follistain-like-4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:21389]	ENSG00000053108	<u>FSTL4</u>
chr5	133332034	133332266	0.000432	ENST00000231512	chromosome 5 open reading frame 15 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:20656]	ENSG00000113583	<u>C5orf15</u>
chr5	179248977	179249123	0.00085	ENST00000356834	TBC1 domain family, member 9B (with GRAM domain) [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:29097]	ENSG00000197226	<u>TBC1D9B</u>
chr5	179712861	179713054	0.00085	ENST00000253778	glutamine-fructose-6- phosphate transaminase 2 [Source	ENSG00000131459	<u>GFPT2</u>
chr5	179993701	179993928	0.000432	ENST00000261937	fms-related tyrosine kinase 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3767]	ENSG00000037280	<u>FLT4</u>
chr5	179993701	179993928	0.000432	ENST00000393347	fms-related tyrosine kinase 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:3767]	ENSG00000037280	FLT4
chr5	669719	669881	0.000432	ENST00000264935	Centrosomal protein 72kDa [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:25547]	ENSG00000037280	<u>CEP72</u>
chr10	116228504	116228691	0.000808	ENST00000277895	actin binding LIM protein I [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:78]	ENSG00000099204	<u>ABLIM1</u>
chr10	116228504	116228691	0.000808	ENST00000369252	actin binding LIM protein I [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:78]	ENSG00000099204	ABLIM1
chr10	116228504	116228691	0.000808	ENST00000369253	actin binding LIM protein I [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:78]	ENSG00000099204	ABLIM1
chr10	116228504	116228691	0.000808	ENST00000369256	actin binding LIM protein I [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:78]	ENSG00000099204	ABLIM1
chr10	116228504	116228691	0.000808	ENST00000369266	actin binding LIM protein I [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:78]	ENSG00000099204	ABLIM1
chr10	116228504	116228691	0.000808	ENST00000392952	actin binding LIM protein I	ENSG00000099204	ABLIM1

					[Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:78]		
chr10	116228504	116228691	0.000808	ENST00000392955	actin binding LIM protein I [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:78]	ENSG00000099204	ABLIM1
chr14	91625820	91625963	0.000808	ENST00000340660	ataxin 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7106]	ENSG00000066427	<u>ATXN3</u>
chr14	91625820	91625963	0.000808	ENST00000359366	ataxin 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7106]	ENSG00000066427	ATXN3
chr14	91625820	91625963	0.000808	ENST00000393287	ataxin 3 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:7106]	ENSG00000066427	ATXN3
chr16	10687204	10687370	0.000432	ENST00000283025	tektin 5 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:26554]	ENSG00000153060	<u>TEKT5</u>
chr16	15995889	15996071	0.000432	ENST00000399408	ATP-binding cassette, sub- family C (CFTR/MRP), member 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:51]	ENSG00000103222	<u>ABCC1</u>
chr16	15996071	15996071	0.000432	ENST00000399410	ATP-binding cassette, sub- family C (CFTR/MRP), member 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:HGNC:51]	ENSG00000103222	ABCC1

Se muestran en negritas los 13 genes totales sin repeticiones que se encontraron en esta primera parte de regiones genómicas asociadas a BIK en base al análisis de los arreglos Tiling.

14. Tabla de funciones encontradas en las proteínas asociadas a BIK

La siguiente tabla muestra las proteínas que son codificadas por los genes que se asocian a BIK en base a los arreglos Tiling y las funciones encontradas en las bases de datos UniProtKB, además de algunas de las publicaciones asociadas a dichas funciones.

Tabla 22. Tabla de funciones encontradas en las proteínas asociadas a BIK

GEN	FUNCIÓN ASOCIADA (ENSEMBL: http://www.ensembl.org/index.html , GeneCards; http://www.genecards.org/)	
	UniProtKB (http://www.uniprot.org/help/uniprotkb)	Publicaciones
MOB4	<p>Q9Y3A3 (PHOCN_HUMAN) May play a role in membrane trafficking, specifically in membrane budding reactions. http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y3A3</p>	
MTA3	<p>Q9BTC8 (MTA3_HUMAN) Plays a role in maintenance of the normal epithelial architecture through the repression of SNAIL transcription in a histone deacetylase-dependent manner, and thus the regulation of E-cadherin levels. Contributes to transcriptional repression by BCL6. http://www.uniprot.org/uniprot/Q9BTC8</p>	<p>1. "MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer." PMID: 12705869</p> <p>2. "MTA3 and the Mi-2/NuRD complex regulate cell fate during B lymphocyte differentiation." PMID: 15454082</p>
ASTL	<p>Q6HA08 (ASTL_HUMAN) Oocyte-specific oolemmal receptor involved in sperm and egg adhesion and fertilization. Plays a role in the polyspermy inhibition. Probably acts as a protease for the post-fertilization cleavage of ZP2. Cleaves the sperm-binding ZP2 at the surface of the zona pellucida after fertilization and cortical granule exocytosis, rendering the zona pellucida unable to support further sperm binding (By similarity). http://www.uniprot.org/uniprot/Q6HA08#section_comments</p>	
FSTL4	<p>Q6MZW2 (FSTL4_HUMAN) Calcium-binding http://www.uniprot.org/uniprot/Q6MZW2</p>	
C5orf15	<p>Q8NC54 (KCT2_HUMAN) --- http://www.uniprot.org/uniprot/Q8NC54 GeneCards http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=C5orf15</p>	

TBC1D9B	<p style="text-align: center;">Q66K14 (TBC9B_HUMAN)</p> <p>May act as a GTPase-activating protein for Rab family protein(s)</p> <p style="text-align: center;">http://www.uniprot.org/uniprot/Q66K14</p>	
GFPT2	<p style="text-align: center;">O94808 (GFPT2_HUMAN)</p> <p>Controls the flux of glucose into the hexosamine pathway. Most likely involved in regulating the availability of precursors for N- and O-linked glycosylation of proteins.</p> <p style="text-align: center;">http://www.uniprot.org/uniprot/O94808</p>	
FLT4	<p style="text-align: center;">P35916 (VGFR3_HUMAN)</p> <p>Tyrosine-protein kinase that acts as a cell-surface receptor for VEGFC and VEGFD, and plays an essential role in adult lymphangiogenesis and in the development of the vascular network and the cardiovascular system during embryonic development. Promotes proliferation, survival and migration of endothelial cells, and regulates angiogenic sprouting. Signaling by activated FLT4 leads to enhanced production of VEGFC, and to a lesser degree VEGFA, thereby creating a positive feedback loop that enhances FLT4 signaling. Modulates KDR signaling by forming heterodimers. The secreted isoform <u>3</u> may function as a decoy receptor for VEGFC and/or VEGFD and play an important role as a negative regulator of VEGFC-mediated lymphangiogenesis and angiogenesis. Binding of vascular growth factors to isoform <u>1</u> or isoform <u>2</u> leads to the activation of several signaling cascades; isoform <u>2</u> seems to be less efficient in signal transduction, because it has a truncated C-terminus and therefore lacks several phosphorylation sites. Mediates activation of the MAPK1/ERK2, MAPK3/ERK1 signaling pathway, of MAPK8 and the JUN signaling pathway, and of the AKT1 signaling pathway.</p> <p>Phosphorylates SHC1. Mediates phosphorylation of PIK3R1, the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. Promotes phosphorylation of MAPK8 at 'Thr-183' and 'Tyr-185', and of AKT1 at 'Ser-473'.</p> <p style="text-align: center;">http://www.uniprot.org/uniprot/P35916</p>	<p style="text-align: right;">15 Publicaciones</p> <p style="text-align: center;">- "Vascular endothelial growth factor receptor-3 and focal adhesion kinase bind and suppress apoptosis in breast cancer cells."</p> <p style="text-align: right;">PMID: 16452200</p> <p style="text-align: center;">http://cancerres.aacrjournals.org/content/66/3/1446.full.pdf+html</p>
CEP72	<p style="text-align: center;">Q9P209 (CEP72_HUMAN)</p> <p>Involved in the recruitment of key centrosomal proteins to the centrosome. Provides centrosomal microtubule-nucleation activity on the gamma-tubulin ring complexes (gamma-TuRCs) and has critical roles in forming a focused bipolar spindle, which is needed for proper tension generation between sister chromatids. Required for localization of KIZ, AKAP9 and gamma-tubulin ring complexes (gamma-TuRCs) (PubMed:19536135). Involved in centriole duplication. Required for CDK5RAP22, CEP152, WDR62 and CEP63 centrosomal localization and promotes the centrosomal localization of CDK2 (PubMed:26297806).</p> <p style="text-align: center;">http://www.uniprot.org/uniprot/Q9P209</p>	<p style="text-align: right;">2 Publicaciones:</p> <p style="text-align: center;">"Cep72 regulates the localization of key centrosomal proteins and proper bipolar spindle formation."</p> <p style="text-align: center;">"Centriolar satellites assemble centrosomal microcephaly proteins to recruit CDK2 and promote centriole duplication."</p>
ABLIM1	<p style="text-align: center;">O14639 (ABLIM1_HUMAN)</p> <p>May act as scaffold protein (By similarity). May play a role in the development of the retina. Has been suggested to play a role in axon guidance.</p> <p style="text-align: center;">http://www.uniprot.org/uniprot/O14639</p>	<p style="text-align: center;">"Molecular characterization of abLIM, a novel actin-binding and double zinc finger protein."</p> <p style="text-align: right;">PMID: 9245787</p> <p style="text-align: center;">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2141644/</p>

ATXN3	<p>P54252 (ATX3_HUMAN)</p> <p>Deubiquitinating enzyme involved in protein homeostasis maintenance, transcription, cytoskeleton regulation, myogenesis and degradation of misfolded chaperone substrates. Binds long polyubiquitin chains and trims them, while it has weak or no activity against chains of 4 or less ubiquitins. Involved in degradation of misfolded chaperone substrates via its interaction with STUB1/CHIP: recruited to monoubiquitinated STUB1/CHIP, and restricts the length of ubiquitin chain attached to STUB1/CHIP substrates and preventing further chain extension. In response to misfolded substrate ubiquitination, mediates deubiquitination of monoubiquitinated STUB1/CHIP. Interacts with key regulators of transcription and represses transcription: acts as a histone-binding protein that regulates transcription.</p> <p>http://www.uniprot.org/uniprot/P54252</p>	<p>4 Publicaciones:</p> <p>"Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities."</p> <p>PMID: 12297501</p> <p>http://www.jbc.org/content/277/47/45004.1 ong</p> <p>"JosD1, a membrane-targeted deubiquitinating enzyme, is activated by ubiquitination and regulates membrane dynamics, cell motility, and endocytosis."</p> <p>PMID: 23625928</p> <p>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3682520/</p>
TEKT5	<p>Q96M29 (TEKT5_HUMAN)</p> <p>Structural component of ciliary and flagellar microtubules. Forms filamentous polymers in the walls of ciliary and flagellar microtubules (By similarity).</p> <p>http://www.uniprot.org/uniprot/Q96M29</p>	
ABCC1	<p>P33527 (MRP1_HUMAN)</p> <p>Mediates export of organic anions and drugs from the cytoplasm. Mediates ATP-dependent transport of glutathione and glutathione conjugates, leukotriene C4, estradiol-17-beta-o-glucuronide, methotrexate, antiviral drugs and other xenobiotics. Confers resistance to anticancer drugs. Hydrolyzes ATP with low efficiency.</p> <p>http://www.uniprot.org/uniprot/P33527</p>	<p>3 Publicaciones:</p> <p>"Characterization of a leukotriene C4 export mechanism in human platelets: possible involvement of multidrug resistance-associated protein 1."</p> <p>PMID: 10064732</p> <p>http://www.jlr.org/content/40/3/439.full.pdf+html</p>

De las 13 proteínas analizadas en el presente trabajo, solo una de ellas (C5orf15), no cuenta con una descripción detallada o demostración de su función, y para el resto se enumeran los registros dentro de las bases de datos y algunas de las publicaciones consideradas más destacadas.

15. Interactoma de las proteínas analizadas asociadas a BIK

El interactoma fue realizado en base a la descripción de las proteínas codificadas por los genes obtenidos en los arreglos, cotejadas en la base de datos HIPPIE y organizado en el programa Cytoscape, con el fin de mostrar la interacción entre ellas.

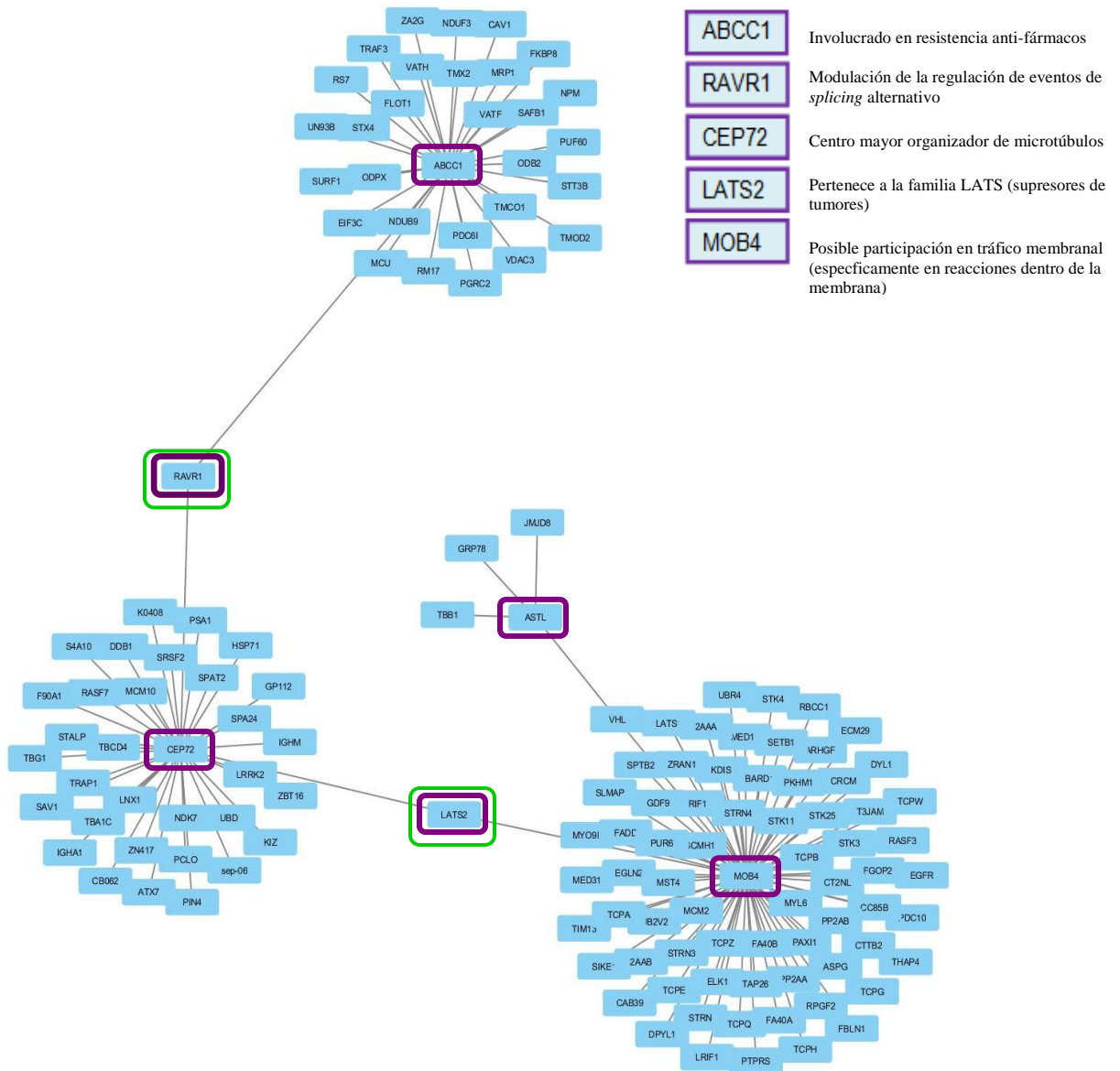


Figura 30. Mapa de interacción de las proteínas asociadas al DNA de las células MDA-MB-231

Se observan en el centro las proteínas codificadas por las regiones (resaltadas en púrpura), de las que se señala en el cuadro superior derecho su función conocida en la base de datos GeneCards; y en el gráfico se ubican a su alrededor las proteínas con las que se conoce su relación de manera predicha o experimental intraproteínas e interproteínas. Se señalan en color verde aquellas que además parecen tener una posición central en el interactoma.

Del análisis del interactoma, se obtuvieron dos conjuntos sin interacción entre ellos, el primero mostrado de manera separada (**Fig.30**), el segundo (**Fig.31**), que mantiene como unión (línea azul marino) a la proteína ABLMI con la segunda parte mostrada en la página siguiente (**Fig.32**).

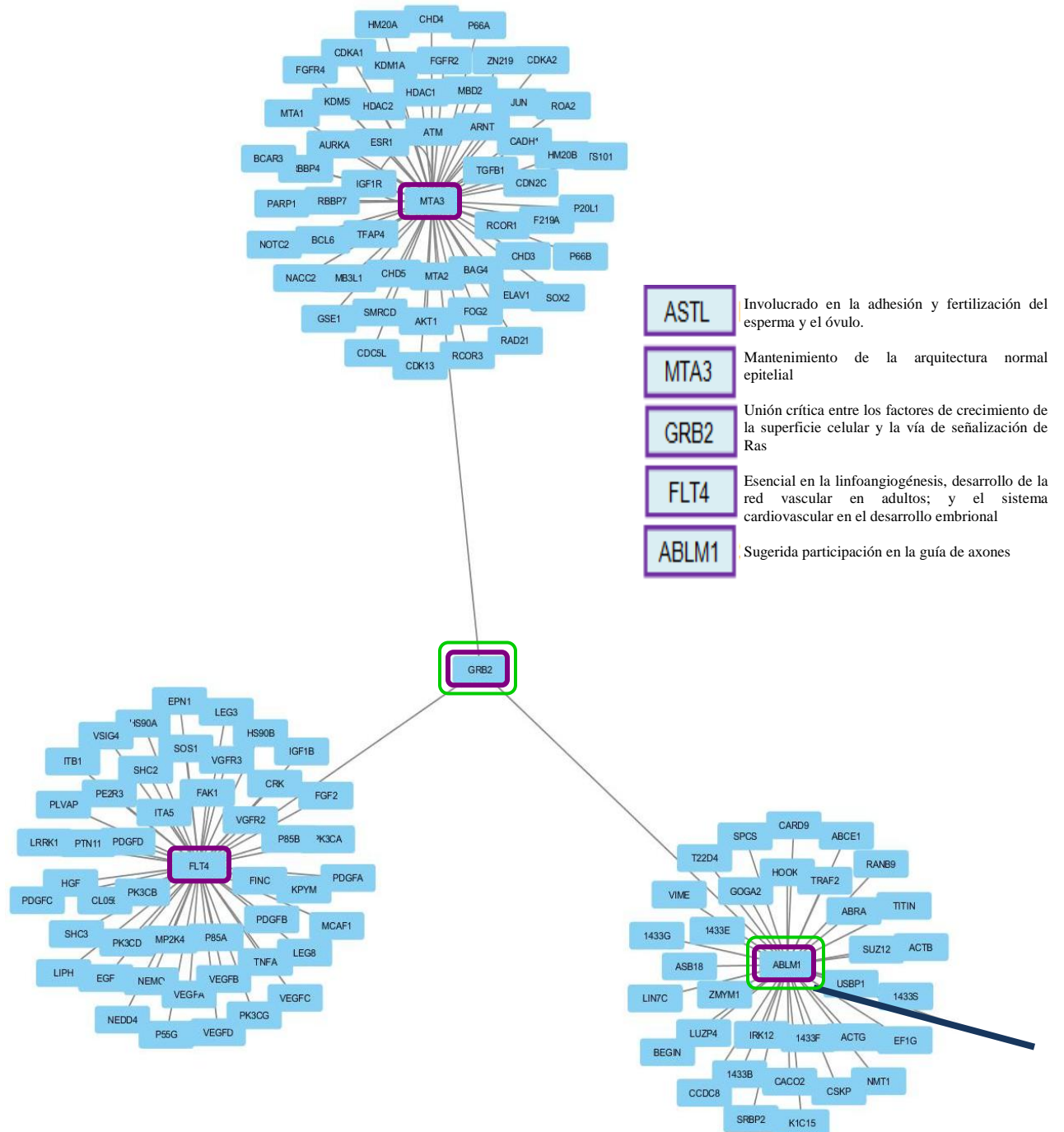


Figura 31. Mapa de interacción de las proteínas asociadas al DNA de las células MDA-MB-231

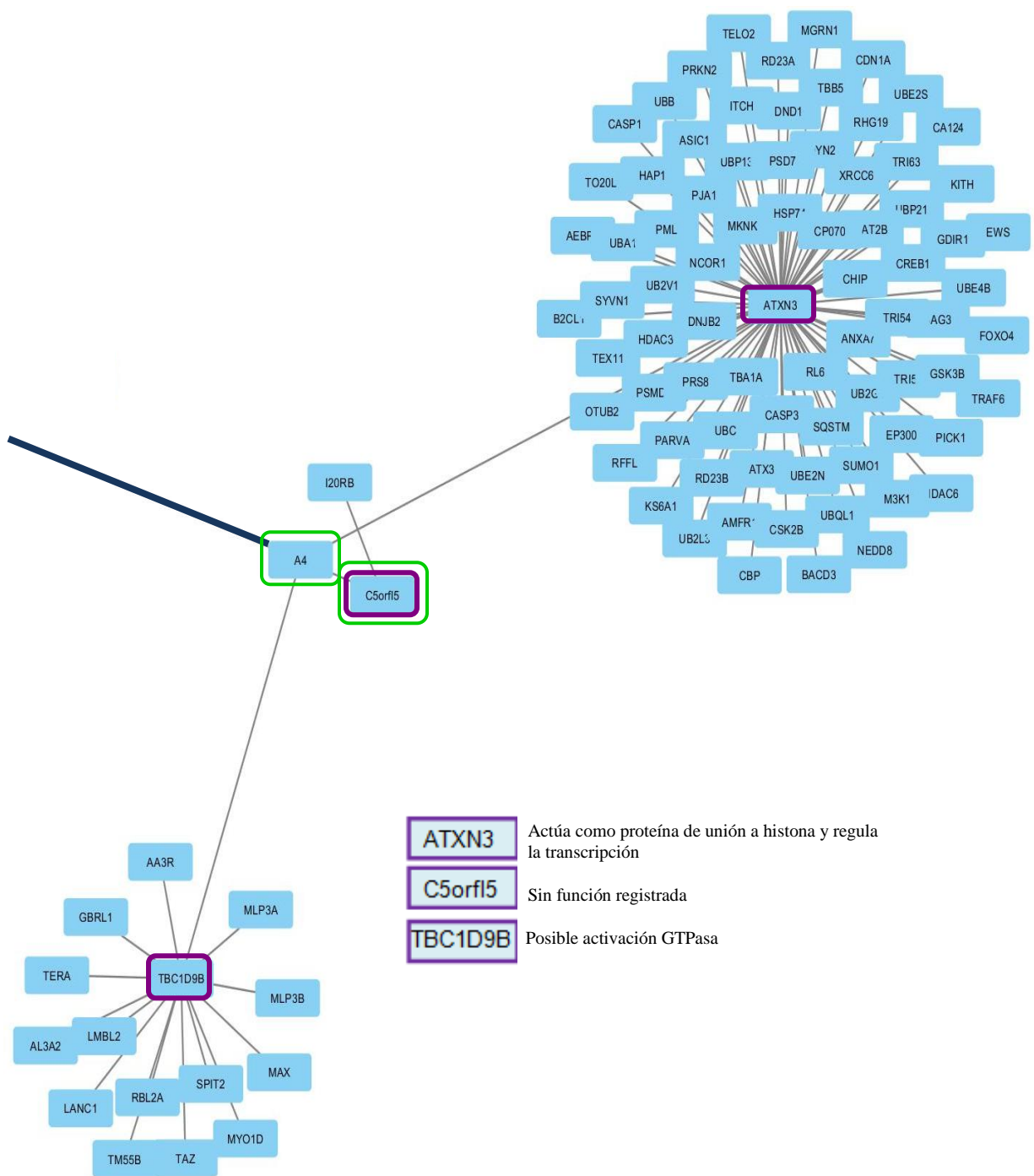


Figura 31. Mapa de interacción de las proteínas asociadas al DNA de las células MDA-MB-231

Segunda parte de la unión del segundo conjunto, unido a la segunda parte en la proteína ABLM1.

X. DISCUSIÓN

Estudios recientes demostraron la presencia de BIK en el núcleo de las células derivadas de CaMa MDA-MB-231 mediante experimentos de microscopía confocal (Trejo-Vargas et al. 2015); sin embargo, el significado biológico de esta localización inusual, fuera de la encontrada en el RE, aún se desconoce. Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar si BIK interacciona con el genoma de las células MDA-MB-231, por medio de la técnica de ChIP-on-chip. Los resultados adquiridos con el presente estudio demostraron que BIK interacciona con 16,000 regiones del DNA de las células de cáncer de mama MDA-MB-231, de las cuales se profundizó en el análisis de solo algunos de ellos.

Existen diversos estudios en los que se ha empleado la técnica de Chip-on-chip, ya que permite el descubrimiento de interacciones DNA-proteína a lo largo del genoma; como por ejemplo la interacción de factores de transcripción con regiones promotoras o modificaciones de histonas con el fin de postular los mecanismos celulares por los cuales una proteína influye en la maquinaria nuclear mediante su interacción con el DNA; sin embargo, varios de ellos omiten pasos cruciales para el desarrollo y reproducibilidad de la técnica. Debido a esto, en el presente trabajo se revisaron varios artículos y se hizo una combinación metodológica de éstos (Gozani Lab, 2005; Cold Spring Harb Protoc, 2009; Denisov S y Brinkmann, 2005); como el uso de un valor intermedio de células a partir de las cuales se obtendría el DNA, el tipo de Buffers de separación nuclear a utilizar, ya que en los diferentes protocolos se mencionan diferencias significativas de reactivos entre ellos, tanto en concentración como en el tipo de detergentes por ejemplo. Así como la velocidad de centrifugación para la obtención de una fase nuclear lo más limpia de citoplasma posible, y los reactivos agregados para lograr una mayor estabilidad de las proteínas fijadas al DNA en la fase nuclear; estos fueron los puntos de mayor importancia que se consideraron para la metodología final.

Cabe mencionar que además de la técnica de ChIP-on-chip, para analizar las interacciones antes mencionadas, también se utiliza la técnica de ChIP-seq, la cual consta de una secuenciación masiva de las regiones asociadas obtenidas por ChIP. Al decidir cuál de las dos técnicas se utilizaría en el presente trabajo se encontró que ambas producen perfiles altamente reproducibles en sus plataformas respectivas de análisis; la ChIP-seq generalmente produce perfiles con un mejor índice señal-ruido y permite la detección de más picos. Sin embargo, es de suma importancia la obtención de librerías de DNA de alta calidad y secuenciadas por completo para el análisis de la ChIP-seq (Ho W, et al., 2011), lo que puede ser complicado de obtener si no han sido arrojadas por experimentos previos o no son de fácil acceso, además del alto costo que puede representar para la metodología completa. Por lo que se decidió trabajar con la técnica de ChIP-on-chip.

Durante la realización de este trabajo, uno de los primeros problemas a solucionar fue la obtención de la cantidad de material genético suficiente para la inmunoprecipitación de la cromatina. Diversos protocolos mencionan que el número de células inicial debe ser de 1×10^6 hasta 5×10^7 como mínimo (Kouskouti A & Kyrnizi I, 2005; Gozani Lab, 2005 y Abcam Technical, entre otros). En nuestra experiencia, se obtuvieron resultados satisfactorios al usar 7.8×10^6 células, obteniendo DNA en concentración suficiente para el resto de la metodología. Cabe mencionar, que se observó una pérdida de material tanto de DNA como de proteínas totales en las mediciones subsecuentes en cuestión de días posteriores a la extracción, debido a los procesos de congelación-descongelación al trabajar con la muestra en el proceso de estandarización, sobre todo en las proteínas totales. Al comprobar la efectividad de los buffers ChIP para la separación de núcleo y citoplasma para la obtención de DNA, mediante la cuantificación espectrofotométrica se observó cierta cantidad de DNA en la fase citoplasmática, lo cual puede deberse al remanente de DNA mitocondrial en esta fracción y los falsos positivos debido a la alta cantidad de sales en esta fracción por el mismo método de separación de fracciones. En base al alto coeficiente 260/230 obtenido en promedio de 61.88 ± 70.83 (**Tabla 16**), se puede decir que la contaminación por sales es la razón por la que se observa una cuantificación subestimada de DNA en la fracción citoplasmática, la cual se corroboró libre de DNA al correrla en un gel de agarosa y no observar ninguna señal de material genético (**Figura 18**).

Respecto a las proteínas totales en ambas fracciones también se notó un incremento por μL , de 9 veces mayor en la fracción nuclear con respecto a la citoplasmática (**Tabla 17**), lo cual atribuimos a que en esta fracción el tratamiento con formaldehído para conservación de las uniones DNA-proteínas asociadas y el mantenimiento de los núcleos lo más íntegro posibles hasta el final de la separación, fueron factores importantes para una mejor conservación de las proteínas en dicha fracción. Sin embargo, no se puede descartar la idea de una obtención de similar rendimiento en ambas fracciones, debido a que la linealidad del método de cuantificación de Bradford se pierde por debajo de $1 \mu\text{g}$, por lo que sería importante abordar este detalle con un método de cuantificación de proteínas más sensible como el de BCA (ácido bicinconónico) con una sensibilidad de 0.5 a $10 \mu\text{g}$ para aclarar esta diferencia entre fracciones.

Una vez se analizó el material obtenido por la metodología de ChIP en los arreglos tipo Tiling, se obtuvieron 16,000 regiones genómicas totales de interacción directa con el DNA de las células MDA-MB-231. Se analizaron 13 de ellas, que cuentan con información ya descrita sobre la función biológica de las proteínas que codifican. De acuerdo a las bases de datos de UniprotKB (<http://www.uniprot.org/help/uniprotkb>) y GeneCards (<http://www.genecards.org/>).

Posteriormente con el propósito de intentar darnos una idea de en qué funciones celulares podría estar impactando BIK mediante la asociación con las regiones genómicas encontradas, y desde esta interacción a nivel de DNA podría jugar un papel en la posible regulación de mecanismos que afecten ya sea directa o indirectamente a las proteínas codificadas por dichas regiones; se buscaron las interacciones de éstas con otras proteínas a nivel experimental, en la base de datos HIPPIE: (<http://cbdm-01.zdv.uni-mainz.de/~mschaefer/hippie/hippie>); y en base a lo anterior, se intentó abordar de manera más puntual a aquellas que mostraron relevancia biológica, relacionada con un proceso neoplásico, ya sea debido a que se ha descrito su relación con CaMa anteriormente o por su relación con procesos de progresión tumoral y/o metástasis.

Una de estas proteínas -relacionas a procesos neoplásicos- es MTA3 (Miembro 3 de la familia asociada a metástasis 1), proteína que representa un componente estrógeno dependiente del co-represor transcripcional Mi-2/NuRD. Se ha demostrado que MTA3 es un regulador clave en la vía estrógeno dependiente, que regula el crecimiento y la diferenciación celular; esto se concluyó al observar que la ausencia de receptores de estrógeno (RE) o de MTA3 lleva a expresiones aberrantes del represor transcripcional SnaiI, el cual es un regulador maestro de las transiciones epiteliales a mesenquimales (TEM) (Ning Z, et al., 2014). Sabiendo que cuando existe una expresión aberrante de SnaiI, existe una pérdida de la expresión de la molécula de adhesión celular E-caderina, se pueden asociar de manera indirecta la presencia de cambios en la arquitectura epitelial y un crecimiento invasivo de las células (Lapidus R, et al., 1998). Lo cual resulta relevante cuando se agrega que la expresión de MTA3 está estrechamente ligada a la acción estrogénica, y si se manipula su expresión, ésta impacta de manera importante en los niveles de SnaiI y E-caderina. Lo cual indica una relación directa de la transcripción de SnaiI, por la presencia de MTA3, e identifica una vía de regulación que contribuye al mantenimiento normal de la arquitectura del epitelio. Por lo tanto, sabiendo que MTA3 está regulada por los receptores de estrógeno, y que éstos sólo se expresan en células ER (+), y que en las células MDA-MB-231 sólo existe presencia del mRNA para codificación de los ER's, pero no de la proteína (Naoyuki F, et al, 2003), nos lleva a pensar que BIK, al estar asociado directamente con MTA3, pudiera funcionar como un regulador de su expresión, favoreciendo o así la transición epitelio-mesenquimal en esta línea celular, contribuyendo así a sus propiedades metastásicas.

Bajo esta suposición podría realizarse un análisis de la expresión de MTA3 y E-caderina previo a la interferencia de la expresión de BIK en esta línea celular y posterior a ella, para confirmar el impacto directo de BIK sobre ambas proteínas y demostrar su participación indirecta sobre esta vía de regulación en carcinomas mamarios con propiedades metastásicas.

Cabe mencionar que MTA3 comparte alrededor del 80% de similitud con otros dos miembros de su familia proteica MTA: (MTA1 y MTA2), con varios motivos conservados entre ellas, y la sobre-expresión de

MTA1 ya ha sido asociada con crecimiento metastásico en líneas celulares *in vitro* y con crecimiento invasivo de tumores (Toh Y, et al., 1997); por lo tanto se podría justificar con mayor fuerza la búsqueda de influencia de BIK en esta característica de las células neoplásicas.

Otra proteína que llamó la atención fue VEGFR-3 (Receptor-3 para el Factor de crecimiento vascular endotelial), la cual es una tirosina cinasa que normalmente está sobre-expresada en cáncer y más específicamente en tumores mamarios humanos y líneas celulares de cáncer (Nishida N, et.al. 2004). Además de su participación en la supervivencia celular, VEGFR-3 es un factor primario en la angiogénesis linfática que se ha detectado en el citoplasma de células tumorales del endotelio linfático, adyacente a células cancerosas y en metástasis de carcinomas a nódulos linfáticos (Nishida N, et.al. 2004). Interesantemente, se demostró por primera vez, por Garces C. y colaboradores en (2006), una asociación física directa de VEGFR-3 con FAK (cinasa de adhesión focal), y observaron además que estas dos proteínas comparten muchos compañeros de unión que permiten su interacción indirecta mediante el dominio SH2; este grupo propone que la interacción de estas dos cinasas para suprimir la apoptosis en las células tumorales, entre ellas diferentes líneas celulares de CaMa: BT474, BT20 y MCF7, como controles negativos se usaron las líneas MCF10A y MEFs (Garces C, et al., 2006). Otra característica de interés es que VEGFR-3 tiene localización conocida en el citoplasma, y membranas tanto nuclear como celular, pero este mismo grupo encontró localización nuclear mediante microscopía confocal con FAK, aunque al igual que BIK, el mecanismo por el cual es internalizada al núcleo aún se desconoce.

Se postula también que la ruptura de la interacción entre FAK-VEGFR, mediante un desplazamiento por medio de cambios experimentales en ciertos péptidos, puede funcionar como posible “ventana terapéutica” debido a que una vez hecho este cambio las células cancerosas se ven afectadas en mayor medida que las células normales de mama (Xu, et al., 1996). Por lo que en este caso se tienen similitudes importantes de VEGFR con BIK, al tener un sistema de translocación subcelular desconocido, se abre la oportunidad de explorar la posibilidad de una respuesta positiva al tratamiento antineoplásico al observar si la presencia o ausencia de la expresión de BIK modifica en algo esta importante interacción VEGFR-FAK e impactar así en esta transición epitelial a mesenquimal.

En el caso de la asociación de BIK con la proteína ATXN3 o AT3 (Ataxina 3), ésta última es miembro de la familia de proteínas llamadas DUBs (enzimas deubiquitinizantes); las cuales, se sabe que juegan un papel importante en el proceso celular de macropinocitosis. Dicho proceso depende de la organización de la actina y es regulada por varias moléculas (PI3-cinasa por ejemplo), y varias GTPasas pequeñas (Seki T, et al., 2013). Recientemente se ha asociado estrechamente a ATXN3 con la proteína de la misma familia DUB: JosD1, la cual se postula que afecta la actividad de los reguladores implicados en la dinámica de la

membrana celular y la motilidad celular, además de provocar una activación de la macropinocitosis (Seki T, et al., 2013).

Debido a la importante participación de ATXN3 y su familia proteica en dichos procesos celulares, valdría la pena explorar la posibilidad de que BIK también estuviera implicada en estas funciones de motilidad celular y sobretodo la capacidad de utilizar las capacidades de activación de macropinocitosis de estas proteínas implicadas, siendo que aún no se tiene claro cómo es que BIK es capaz de localizarse en el núcleo celular de las células MDA-MB-231, debido a que si carece de señales de localización nuclear que la trasloquen desde el citoplasma o si sea capaz de permitir su entrada al núcleo mediante este medio con su sola interacción con las proteínas DUBs. En este caso valdría la pena explorar si BIK interacciona solo con la región que codifica a ATXN3 o si de manera extraordinaria interacciona de manera directa con ella, en cuyo caso podría ayudar a BIK a cambiar su localización subcelular.

Por otro lado, también se sabe que Ataxina-3 posee un dominio de poli-glutamina, cuando se encuentra mutada, y esto es responsable de patologías neurodegenerativas como la ataxia espinocerebelar y la enfermedad de Huntington, entre otras (Fusheng Li, et al., 2002). En el caso de BIK, siendo que se desconocía su interacción directa con regiones codificantes de estas proteínas DUBs y esto sugiere fuertemente su participación en la regulación de la transcripción celular en base a su localización nuclear, aún se desconoce si su efecto es directo o mediado por otras proteínas a ciencia cierta el mecanismo por el cual podría hacerlo, lo que podría dar pistas sobre los mecanismos utilizados por BIK, ya sea por acción propia o mediante la asociación con proteínas que tienen esta capacidad de interacción con el material genético y la transcripción. Para AT3 se sugiere que su componente endógeno se une a los co-activadores CBP/p300 (complejo co-activador transcripcional) y PCAF (histona acetiltransferasa); por lo tanto AT3 reprime la transcripción mediante dos mecanismos: el primero involucra el dominio C-terminal que contiene a su vez al dominio poli-glutamina, y el segundo mecanismo recién identificado es el de represión mediante el dominio N-terminal, el cual concuerda con la unión a histona y a su enmascaramiento. Reprimiendo así la transcripción por estos dos mecanismos, además de que los dominios fuera del poli-glutamina también son capaces de realizar esta represión (Fusheng Li, et al., 2002).

Por lo que si Ataxina-3 posee esta capacidad de represión transcripcional, valdría la pena observar hasta qué punto la interacción de BIK con la región genómica que la codifica podría estar influyendo en esta función de represión.

Hablando de la importancia de los dominios terminales para la función de determinada proteína, hasta ahora se sabe que el dominio C-terminal de BIK es indispensable para la actividad apoptótica además de ser importante para maximizar su actividad pro-apoptótica y que el N-terminal constituye el núcleo necesario para el motivo de heterodimerización con los miembros de la familia Bcl-2 (Elangovan y

Chinnadurai, 1997), pero sabiendo de una asociación de BIK con la región codificante de una proteína como Ataxina-3, en la cual sus dominios C y N-terminales están implicados a su unión a histonas y por consiguiente la alteración de la transcripción, sería posible buscar el sitio o dominio específico por el cual BIK interacciona con el DNA, es decir, si lo hace al igual que Ataxina-3, por medio de alguno de sus dos dominios terminales, y si se une a las histonas, con lo cual se podría sentar un precedente del mecanismo por el cual podría estar participando en la mecánica transcripcional de estas células con características metastásicas.

Otras proteínas de relevancia, en base a la manera en que participan y se ubican de manera central en el interactoma (señaladas en púrpura en la **Fig. 30, 31 y 32**), se discutirán las más relevantes, las cuales se están involucradas en los procesos celulares de organización de microtúbulos (CEP72) y tráfico intramembranal (MOB4) por ejemplo.

Respecto a CEP72, ya se ha asociado a BRCA1 (Supresor de tumores de cáncer de mama 1), debido a que se ha observado que al igual que la pérdida de BRCA1, la sobreexpresión de CEP72 en cáncer está asociada a una división celular mitótica aberrante y la inducción de inestabilidad cromosómica (Lüddecke S, 2016). Su expresión se ha observado raramente afectada en CaMa, sin embargo está altamente expresado y asociado a inestabilidad cromosómica en cáncer colorectal (Lüddecke S, 2015). Por lo que es una de las proteínas que se asocia directamente a la inestabilidad cromosómica observada en esta neoplasia y sobretodo en conjunto con un supresor de tumores altamente estudiado y usado en el pronóstico y tratamiento del CaMa como lo es BRCA1.

Mientras que en el caso de MOB4 (ramificación de la familia proteica MOB, proteínas de interacción con cinasas para regulación del ciclo celular y morfología celular), se encuentra pobremente caracterizada en la literatura, aun cuando presenta un 80% de homología con la proteína de *D. melanogaster* y la humana. Además de que su mal funcionamiento, ha sido relacionado con el cáncer (Schulte J, et al, 2010). En células HeLa se demostró su interacción directa con SG2NA (proteína de señalización, de unión a calmodulina dependiente de calcio), y fue confirmada su co-localización *in vivo* (Baillat G, et al, 2001). Unión que coincide también con la función de la proteína de la región asociada a BIK de la proteína FSTL4 (**Tabla 20**), la cual también es responsable de procesos celulares involucrados en la unión de calcio. A pesar de que FSTL4 no figura en el interactoma debido a que no se encontraron interacciones en la base de datos HIPPIE (<http://cbdm-01.zdv.uni-mainz.de/~mschaefer/hippie/>); dichas funciones, de unión a calcio ya sea directamente o mediante calmodulina como es el caso de MOB4, son relevantes ya que pueden sugerir la contribución de estas proteínas en procesos involucrados con el uso de calcio en la maquinaria celular. Se sabe que la presencia del ion divalente de calcio es uno de los segundos mensajeros más

ampliamente utilizados en la señalización celular, tanto que difícilmente se encontraría un proceso en células de mamíferos en el que no se viera involucrado (Schulte J, et al, 2010).

Sin embargo, cuando se observa el interactoma de las proteínas aquí analizadas asociadas a BIK, en concreto la primera parte de este: (**Fig. 30**), podemos observar que una de ellas está involucrada directamente con procesos característicos de células tumorales como resistencia anti-fármacos (ABCC1 o MRP1), y una en supresión de tumores: LATS2 (www.genecards.org). Aunque esta última, junto con RAV1 llamaron nuestra atención, ya que con base en su posición en el interactoma se ubican de manera más centralizada o con una mayor relevancia de interacción debido a que unen a los núcleos de interacción formados por las demás proteínas, por lo que se discutirán de manera particular más adelante y se señalan en verde en las **Fig. 30, 21 y 32**.

Respecto a la resistencia a multidroga se sabe que representa un reto en el tratamiento del cáncer y para el paciente representa una pobre prognosis. Lo cual resulta interesante dado que ya se sabe que las células MDA-MB-231 son triple negativas para los receptores de estrógeno necesarios para el tratamiento del CaMA, función que podría explorarse para saber de qué manera impacta la probable asociación de BIK con ABCC1 con la resistencia de estas células al tratamiento estrogénico, y demostrar además si esta relación es directa, es decir, que si al inhibir la expresión de ABCC1 en la línea celular, se observa una alteración en la presencia de estos receptores o por el contrario su presencia permanece inalterada.

También se sabe que ABCC1/MRP1, transporta un amplio rango de agentes terapéuticos, además de que posiblemente participe en la resistencia a multidroga (RMD), de varios tipos de cáncer incluyendo pulmón, mama, próstata y neuroblastoma (Munoz M, et al, 2007). Y se ha demostrado por primera vez a nivel de regulación con micro-RNAs, la relevancia del miR-326 en la capacidad de multiresistencia a fármacos mediada por MRP-1, sugiriendo a este micro-RNA como un probable agente eficiente para prevenir y combatir la RMD en células tumorales (Liang Z, et al, 2009).

Lo cual justifica como posible perspectiva, el realizar un “*screening*” de micro RNAs expresados en la línea celular que trabajamos (MDA-MB-231), ya sea sobre o sub-expresados y encontrar así una asociación entre la interacción de proteínas como ABCC1 con el DNA de las células MDA-MB-231 y la alteración de la expresión de estos, así como su impacto en la maquinaria de regulación de las estas células neoplásicas mediante estudios bioinformáticos y funcionales posteriores. Pudiendo explorar además, que tanto impacta la alteración de estos genes encontrados para contribuir o explicar inclusive, la capacidad de resistencia anti-fármacos que podría aportar ABCC1 a las células MDA-MB-231 para contribuir a las alteraciones observadas en estas células en forma de poca respuesta a fármacos debido a la ausencia de receptores hormonales.

Como se comentó anteriormente, hubo ciertas proteínas que llamaron nuestra atención en base a su posición central y conectiva entre núcleos del interactoma (coloración verde en la **Fig. 30, 31 y 32**). Aquellas en la primera parte del interactoma (**Fig. 30**), también están relacionadas con procesos que podrían contribuir a la malignidad de las células MDA-MB-231, al verse alterados procesos celulares de relevancia como: regulación de splicing alternativo (RAVR1), supresión de tumores (LATS2), unión crítica entre los factores de crecimiento de la superficie celular y la vía de señalización de Ras (GRB2) (**Fig. 31**) y C5orf15 (Marco de apertura 15 del cromosoma 5 o en inglés: *Chromosome 5 Open Reading Frame 15*) (**Fig.32**) de la que aún se desconoce su función (www.genecards.org); pero la proteína resultante de la secuencia KCT2 (Proteína transmembranal asociada a keratinocitos 2), se describe como una proteína con sublocalización celular membranal de paso simple tipo I [Q8NC54 UniprotKB], las cuales atraviesan a lo largo de la membrana y su extremo N-terminal se coloca en el lado extracelular de la membrana, lo cual remueve su secuencia señal (www.uniprot.org).

En el caso de RAVR1, dado que se sabe está involucrado en procesos de “splicing” o corte y empalme del mRNA (proceso que le otorga variabilidad al genoma). Dicho proceso ha sido correlacionado en varios genes con la progresión epitelio mesenquimal (PEM), aunque la extensión de los cambios en el splicing y sus contribuciones a la conversión morfológica que acompañan a la PEM no se ha llegado a comprender del todo (Shapiro I, et al. 2011). El grupo de Shapiro y col., determinaron la firma de splicing alternativo de las transiciones epitelio-mesenquimales (TEM), mediante un análisis de secuenciación de RNA (RNA-seq) en un modelo establecido de cultivo celular, identificando que la proteína RAVR1 o RAVR1 se encuentra desregulada en un aproximado de 4 veces la expresión normal; la relevancia de esta expresión a la baja se debe a que los niveles de expresión de muchas proteínas de unión a RNA (RBPs en inglés), asociadas con motivos enriquecidos cerca de los exones reguladores de la TEM, cambian durante el proceso de transición epitelio-mesenquimal. Por lo tanto estas observaciones sugieren que cambios en los niveles y actividad de varios factores diferentes de splicing, tal vez contribuyan a los cambios de splicing observados en la transición epitelio-mesenquimal (Shapiro I, et al. 2011).

Dicha característica de RAV1, concuerda totalmente con otra proteína también relacionada con BIK en nuestro estudio: MTA3 [Discusión, Pág. 83], la cual también influye indirectamente en la transición epitelio-mesenquimal mediante SnaiI. Lo cual podría representar otra oportunidad para estudiar más a fondo si estas dos proteínas involucradas en la TEM: MTA3 y RAV1 con la que se observó BIK podría interactuar, le confieren ya sea en conjunto o individualmente, las características de malignidad características a estas células, se podría identificar además si MDA-MB-231 tiene ciertas mutaciones ligadas a este tipo de transformación y/o realizar experimentos funcionales que comprueben la presencia

activa de esta transición en estas células; más aún si en el caso de RAV1 ya ha sido asociada su participación en CaMa específicamente (Slusarczyk A, et al. 2010).

Se ha demostrado también que RAVR1 es una de las proteínas de unión a RNA que se encuentran enriquecidas en el espacio perinucleolar (EPN); y la relevancia de esta observación es que dicho EPN es un cuerpo subnuclear que se forma en células cancerosas, y se ha correlacionando su presencia con una progresión de la enfermedad y mal pronóstico para los pacientes. Dicha observación se realizó en muestras de tejido tumoral de pacientes con carcinoma colorectal, cáncer de mama y líneas celulares estudiadas *in vitro* (Slusarczyk A, et al. 2010).

Se sabe además, que estas estructuras perinucleolares se asocian físicamente con el nucléolo, pero contiene de pocos a nulos factores nucleolares o ribosomas recién sintetizados. Dado que esta estructura es resultado de una transformación avanzada, se propone que representaría una adaptación fisiológica celular para ayudar a mantener y sustentar el estado de malignidad de las células cancerígenas (Slusarczyk A, et al. 2010).

En nuestro trabajo, esta propuesta es importante, dado que podría representar otra opción de internalización de BIK al núcleo mediante la interacción con proteínas como REVR1 ya sea para tratar de explicar esta localización inusual de BIK, o para proponer una interacción con estas estructuras perinucleolares mediante la búsqueda de dichas estructuras en las células MDA-MB-231 para afirmar o descartar la participación de BIK en la interacción con dichas estructuras, o mediante la búsqueda de la interacción directa de BIK en estas estructuras perinucleolares para delimitar exactamente su localización subcelular en el núcleo.

En el caso de la supresión de tumores ya se ha encontrado la significancia de LATS2 en cáncer de mama, pulmón, próstata, cerebro y sangre (WeiQuan L, et al. 2011), y se sabe además, que en respecto a los homólogos mamíferos (*Lats1* y *Lats2*) de la ruta de señalización “Hippo” de regulación de proliferación celular y apoptosis; se observó que mutaciones en *Lats1* causaron tumoraciones de tejido blando en ratones (St John M, et al. 1999). Sin embargo, la delección de *Lats2* es letal en la etapa embrionaria y se sugiere que juega un papel crítico en la estabilidad del genoma y la inhibición del crecimiento (McPherson J, 2004). Papel que también se puede buscar en relación a BIK, es decir, hasta qué grado la capacidad de supresión tumoral que la interacción con LATS2 pudiese impactar en las características altamente metastásicas de las células MDA-MB-231. Además de su comparación con otras líneas celulares de baja malignidad, como MCF7, controles negativos como MCF-10, y células MDA-MB-231 sin expresión de BIK, en donde se esperaría encontrar una expresión de LATS2 en menor proporción de manera significativa respecto a la encontrada en células MDA-MB-231 con expresión activa de BIK.

Se sabe desde 1994 gracias a Daly R y col., que GRB2 (receptor de factor de crecimiento de unión a proteína 2), se encuentra sobre-expresada dos veces el valor basal, en células de CaMa como: MCF7, MDA-MB-361 y MDA-MB-453, tanto a nivel de mRNA, como de proteína, además de correlacionar con

una expresión mayor de los receptores de estrógeno ERBB (Daly R, et al., 1994). Por lo que en base a esta información y la relevancia de la función de GRB2 y su aparente relación con BIK, también se la podría tratar de relacionar específicamente en las células MDA-MB-231, verificando la presencia de su mRNA dentro del *screening* de expresión, como se propuso anteriormente.

Además si se encontrara a nivel de proteína supondría una nueva pregunta de investigación: ¿por qué se encuentra presente en células con expresión negativa de receptores de estrógeno?

Se podría argumentar su participación, debido a que ya se comprobó su presencia en las líneas celulares de CaMa: (MDA-MB-453, -468, -435, MCF-7 Y SKBr3), y se sabe que GRB2 participa en la transmisión de señales oncogénicas mediante la unión con receptores tirosín cinasa (RTC) como ErbB2, que a su vez activa la vía de señalización mitógeno-activada: MAP (compuesta por el complejo de proteínas Ras/Raf/MEK); e interesantemente se observó que la regulación a la baja de la proteína Grb2 puede inhibir el crecimiento de las células en CaMa, y que el grado de la inhibición de crecimiento depende de la activación y/o de los niveles endógenos de los RTC. Y por otro lado, la inhibición de Grb2 inactiva la vía de MAP cinasas en EGFR, pero no en el ErbB2 de las células de CaMa, lo que sugiere que diferentes vías de señalización pueden ser usadas por EGFR y ErbB2 para regular el crecimiento de estas células (Tari A, et al. 1999).

Lo cual resulta relevante, ya que se podría confirmar la interacción directa de BIK con Grb2 en las células MDA-MB-231 y de confirmarse se podría explicar el porqué de la interacción con una proteína que eleva la expresión de receptores estrogénicos cuando las células estudiadas no los tiene; y se podría profundizar con la posibilidad de que la interacción entre ellas aportara a estas células la capacidad de impactar en la vía de las MAP cinasas (mediante el estudio de su participación en esta vía de señalización), y así de alguna manera participar en una regulación que aporte características de malignidad, además de comprobar que estas características permanecen, se carezca o no de los receptores ErbB2 o algún otro RTC en las células, y poder así relacionar la interacción de BIK con esta proteína que parece ser central en el interactoma obtenido en este trabajo.

Interesantemente, una proteína que también parece ser de importancia en el interactoma en base a su posición central en la interacción entre C5orf15 comentada anteriormente, ATXN3 (que funciona como proteína de unión a histona y regulación de la transcripción) y TBC1D98 (con posible activación GTPasa), tal como se observa en la **Fig. 32**, es la proteína A4 (proteína precursora amilode), la cual es una proteína transmembranal altamente expresada en tejido cerebral, pero que recientemente ha sido implicada en algunas enfermedades humanas, y ha sido demostrada su regulación mediante andrógenos. Ambas características sugirieron la importancia de A4 en el carcinoma hormono-dependiente de mama, por lo que Takagi y col., observaron mediante inmunohistoquímica que el 49% de los tejidos de carcinomas

estudiados fueron A4 positivos, con una asociación positiva a receptores androgénicos y a Ki67 (proteína de marcación de proliferación celular), lo que además parece elevar el riesgo de recurrencia en los casos con receptores de estrógeno positivos. Además de que en estudios *in vitro* encontraron que en células MCF-7 y MDA-MB-231 la proliferación celular fue asociada significativamente con el nivel de expresión de A4 (Takagi K, et al., 2013). Lo cual resulta sumamente relevante, dado que el que encontráramos una asociación de BIK con A4, y esta tenga ya pruebas experimentales de su influencia en la proliferación celular, podría reforzar la hipótesis de que BIK también participa de alguna manera en la maquinaria transcripcional en base a esta interacción, además de la interacción de A4 cercana con ATXN3, la cual ya se sabe tiene función en regulación transcripcional. Sumado a la presencia de C5orf15 y que comparte con esta la característica de ser una proteína transmembranal, de la que en el caso de A4 se sabe algunos péptidos localizados en núcleo y citoplasma, tienen la capacidad de ser traslocados al núcleo mediante la interacción con otra proteína (APBB1, proteína precursora beta de unión amiloide, familia B, miembro 1) (www.uniprot.org). Lo que podría resultar en una guía, si se comprobara por ejemplo que BIK interactúa además con APBB1 mediante estudios de co-inmunoprecipitación, en una posible ruta por la que BIK es traslocada al núcleo y como su interacción con proteínas involucradas en la regulación transcripcional podrían comprobar su propia participación y su nivel de participación dentro de las células MDA-MB-231 y su comparación con otras células de menor malignidad.

Esto como se ha mencionado antes, bajo la reserva de validar la interacción directa entre BIK con todas estas proteínas y una exploración más a fondo de la naturaleza de esta interacción, es decir, si es necesaria la interacción de las proteínas observadas en la predicción del interactoma, tanto las encontradas en este estudio y/o las que parecieran ser centrales en la interacción.

Recordando la hipótesis que se realizó al inicio del trabajo, si se supone a BIK como una proteína involucrada en la maquinaria de regulación del material genético en las células MDA-MB-231 tal y como sugiere el análisis de las proteínas con las que se encontró una interacción; surge la importancia de una exploración a fondo del papel que juega el zipper de Leucina en la estructura de BIK con su unión con el DNA, es decir, explorar la posibilidad de que al realizar una ChIP en una estructura de BIK mutada sin los aminoácidos correspondientes al zipper de Leucina o una validación proteína por proteína con estas secuencias mutadas, y comprobar que aún es posible su unión al DNA en la línea celular, y saber de este modo si el que sea la única proteína de la familia que lo tiene, aporte de alguna manera a su capacidad de unión una vez en el núcleo de las células. Ya que como se discutió anteriormente, ya se sabe que el cambio de aminoácidos en su secuencia resulta en cambios en su actividad pro-apoptótica o afinidad de unión a proteínas de su familia por ejemplo.

Aunque hasta ahora no se ha demostrado si estos cambios podrían influir en su capacidad de unión a DNA en estas células, por lo que se podría abordar poco a poco los procesos por los cuales podría estar regulando BIK desde su interacción directa a nivel de DNA en las células MDA-MB-231, a todas aquellas proteínas que codifican estas regiones y podrían participar en procesos celulares más relevantes y de las que se tenga una mayor información para tratar de relacionar el propósito de BIK para formar todas estas interacciones en el núcleo, mediante procesos de validación de manera primaria de la regulación a nivel genómico y posteriormente funcionales y con experimentos *in vitro* para observar cambios en el comportamiento de las células MDA-MB-231 y poder así proponer algún mecanismo celular claro por el cual la presencia de BIK en el núcleo de estas células influye en sus características de malignidad.

XI. CONCLUSIONES

A pesar de las pequeñas omisiones de ciertos pasos en la metodología ChIP, se logró establecer una nueva estandarización para cada uno de los procesos necesarios para llevar a cabo la metodología de ChIP, logrando encontrar en cada etapa las condiciones adecuadas hasta lograr obtener el DNA en la condición necesaria para su análisis en los arreglos Tiling y la obtención de regiones a las que se asocia en las células de cáncer de mama MDA-MB-231.

Se encontró una asociación directa de BIK al DNA de las células MDA-MB-231 en 16,000 regiones y se analizaron de manera específica aquellas no repetidas para 13 genes, de las cuales se encontró que sus transcritos a nivel de proteína contribuyen a varios procesos celulares altamente implicados en la progresión tumoral y una mayor malignidad de células asociadas al cáncer de mama, como: linfangiogénesis, resistencia a la apoptosis, macropinocitosis, crecimiento metastásico en líneas celulares *in vitro* y crecimiento invasivo de tumores y regulación del crecimiento y la diferenciación celular. Además de estar involucradas en procesos de represión transcripcional directa e indirectamente como reguladoras implicados en la dinámica de la membrana celular y la motilidad celular.

Una vez ya se comprobó que BIK interacciona a nivel de DNA con regiones involucradas en todos estos mecanismos celulares, es importante comprobar si BIK influye en dichos procesos celulares mediante la regulación génica, hasta qué punto contribuye a ello y bajo qué mecanismos lo logra. Para poder así comenzar a relacionar de manera estrecha las funciones de las proteínas discutidas anteriormente y tratar de dilucidar hasta donde BIK podría estar contribuyendo en estos procesos y promoviendo la agresividad celular neoplásica observada en las células MDA-MB-231 de CaMa, características que no se observan en otras líneas celulares derivadas de la misma patología y con la ausencia de BIK en localización nuclear.

Por el momento no es posible confirmar que BIK funcione como un factor de transcripción en las células probadas, pero sí podemos decir que interacciona de manera directa con su material genético, y de entre estas regiones de interacción, varias de ellas codifican proteínas con funciones celulares altamente asociadas a procesos celulares desregulados característicos en células transformadas y progresión tumoral como promoción de la angiogénesis, evasión de la apoptosis, transición epitelio-mesenquimal o interacción transcripcional directa. Lo cual podría contribuir de manera importante a las características metastásicas de estas células y valdría la pena explorar posibles mecanismos celulares por los que BIK logre translocarse al núcleo y sea relevante, si no es que necesaria, para la expresión de características de alta malignidad en estas células.

Así como no se encontró una similitud importante de la secuencia del zipper de Leucina de BIK con las características que tienen que cumplir en base a reglas ya establecidas para este tipo de secuencias, por lo que valdría la pena observar si al modificar esta secuencia se limita la capacidad de BIK para unirse al DNA de las células MDA-MB-231, esto con el antecedente de los factores de transcripción en la que esta secuencia les es fundamental.

El encontrar una interacción de BIK a la secuencia genómica que codifica a las proteínas mencionadas y discutidas anteriormente, es relevante, dado que la mayoría de estas proteínas ya han sido relacionadas no solo en procesos neoplásicos en general, sino directamente en CaMa, ya sea por su experimentación directa en este tipo de tejidos o con su relación a procesos altamente involucrados en esta patología en particular, como procesos que involucran receptores hormonales, con los cuales ya se sabe el CaMa está altamente relacionado.

Además, la interacción con regiones no codificantes también es de relevancia experimental debido al auge de regiones de este tipo, y a su relación con funciones reguladoras que aún se desconocen, pero podrían contribuir al desarrollo de este proceso neoplásico.

XII. PERSPECTIVAS

- ❖ Búsqueda de la región específica de BIK que se asocia al DNA, si esta se encuentra en el zipper de Leucina dentro de su estructura y si los dominios C y N-terminal contribuyen de manera positiva en la unión, o que aminoácidos son los esenciales para que esta asociación se lleve a cabo.
- ❖ Encontrar hasta qué punto influye el zipper de Leucina en la secuencia de BIK para lograr una unión exitosa al DNA.
- ❖ Análisis de la presencia y valores de proteínas asociadas con relevancia en procesos celulares característicos tumorales como pérdida de la arquitectura normal epitelio mesénquima, evasión de la apoptosis entre otras, mediante el análisis de las proteínas involucradas en estos procesos: FAK, MTA3, VEGFR-3, ATX3, MRP1; de los co-activadores CBP/p300, PCAF, e histonas H3 y H4, antes y después de la interferencia de BIK para su mejor asociación con la misma.
- ❖ Valoración de la expresión de proteínas de interacción con BIK cuando esta es interferida y observar así si la expresión de estas proteínas cambia, es decir, si su expresión es dependiente a la presencia de BIK y así su función.
- ❖ Explorar si hubiese alguna interacción directa de los productos proteicos de las regiones genómicas encontradas asociadas con BIK, o de aquellas con mayor interés biológico por Co-inmunoprecipitación, PCR y Western Blot.
- ❖ De encontrar alguna asociación directa a nivel de proteína se podría buscar alguna asociación de una expresión diferente a la esperada de las proteínas de interés (con regiones genómicas asociadas a BIK) en tejidos de diversos estadios de CaMa para verificar su alteración a nivel proteico y posible asociación a la malignidad progresiva de las tumoraciones.

XIII. REFERENCIAS

- American Cancer Society (ACS) (2015). ¿Qué es el Cáncer?, <http://www.cancer.org/espanol/cancer/aspectosbasicossobreeelcancer/que-es-el-cancer>, consultado el 06/07/15.
- American Type Culture Collection (ATCC) (2014) MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™). Consultado desde: <http://www.atcc.org/products/all/HTB-26.aspx#generalinformation>, el 16/12/2015.
- Alanis-Lobato G, Andrade-Navarro M y Schaefer M. (2017) *HIPPIE: Human integrated protein-protein interaction reference*. Oxford University Press. Recuperado de: <http://cbdm-01.zdv.uni-mainz.de/~mschaefer/hippie/>.
- Aouacheria, A. (2005) Phylogenomics of Life-Or-Dead Switches in Multicellular Animals: Bcl-2, BH3-Only, and BNip Families of Apoptotic Regulators. *Mol. Biol. Evol.* (12): 2395-2416.
- Baillat G, et al. (2001) Molecular cloning and characterization of phocein, a protein found from the golgi complex to dendritic spines. *Mol Biol Chem* (3): 663-673.
- Beum Jun, et al. (2015) A 3D in situ cell counter reveals that breast tumor cell (MDA-MB-231) proliferation rate is reduced by the collagen matrix density. *Biotechnol Prog* (4): 990-996.
- Bertucci F, et al. (2004) Gene expression profiling for molecular characterization of inflammatory breast cancer and prediction of response to chemotherapy. *Cancer Res* (64): 8558-8565.
- Bornberg-Bauer E, Rivals Eric y Vingron Martin. (1998) Computational approaches to identify leucine zippers. *Nucleic Acids Research* (26):2740-2746.
- Bowie J. (2000) Understanding membrane protein structure by design. *Nature Structural Biology*; (7): 91-94.
- Boyd J, Gallo G, Elangovan B, Houghton A, Malstrom S, Avery B, et al. (1995) Bik, a novel death-inducing protein shares a distinct sequence motif with Bcl-2 family proteins and interacts with viral and cellular survival-promoting proteins. *Oncogene* (11):1921–1928.
- Cairão F y Domingos P M. (2010) Apoptosis: Molecular Mechanisms. Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons. Pág. 1-8.
- Cell Biolabs (2011) Product Data Sheet: MDA-MD-231/GFP Cell Line. Consultado desde: www.cellbiolabs.com, el 24/09/13.
- Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) (2014). Tasas de cáncer de mama por raza y grupo étnico. Consultado desde: <http://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/statistics/race.htm>, el 07/07/15.

- Charafe-Jauffret E, et al. (2006) Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogene* (25): 2273-2284.
- Chinnadurai G, Vijayalingam S, and Ramachandran R. (2008) BIK-the founding member of the BH3-only family proteins: Mechanisms of cell death and role in cancer and pathogenic processes. NHI Public Acces, *Oncogene* 27(Suppl 1): S20-S29.
- Daly R, Binder M y Sutherland R. (1994) Overexpression of the Grb2 gene in human breast cancer cell lines. *Oncogene* (9):2723-2727.
- Daniel PT, Pun KT, et al. (1999) Expression of the death gene Bik/Nbk promotes sensitivity to drug-induced apoptosis in corticosteroid-resistant T-cell lymphoma and preventstumor growth in severe combined immunodeficient mice. *Blood* (94): 1100-1107.
- Dirección general de comunicación social (DGCS) (2018). La mortalidad por cáncer de mama aumenta en México. Boletín UNAM-DGCS-677. Ciudad Universitaria. Consultado el 26/02/19, desde: http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2018_677.html.
- Elangovan B, and Chinnadurai G. (1997) Functional Dissection of the Pro-apoptotic Protein Bik: Heterodimerización with anti-apoptosis proteins is sufficient for induction of cell death. *J. Biol. Chem* (272): 24494-24498.
- Farnham P. (2009) Insights from genomic profiling of transcription factors. *Nat Rev Genet.* (9): 605-616.
- Fernández Reyes E y Galván Cejudo A. (2014). Métodos para la cuantificación de proteínas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Córdoba, España. Pág. 1-7.
- Fusheng Li, et al. (2002) Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities. *The Journal of Biological Chemistry* 47 (277): 45004-45012.
- Garces C, et al. (2006) Vascular endothelial growth factor receptor-3 and focal adhesion kinase bind and suppress apoptosis in breast cancer cells. *Cancer Research* (66): 1446-1454.
- García N, Salamanca F, et al. (2005) A molecular analysis by gene expression profiling reveals Bik/NBK overexpression in sporadic breast tumor samples of Mexican females. *BMC Cancer* 5:93.
- GeneCards (2018) Human Gene Database. Consultado el 18/02/16, 09/02/18, desde: <http://www.genecards.org/>.
- Germain M, Mathai J, et al. (2005) Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodeling of mitochondrial cristae during apoptosis. *The EMBO Journal* (24): 1546-1556.

- Giraldo G, Loango N y Mejía C. (2010). Laboratorio de bioquímica: una visión práctica. Facultad de ciencias básicas y tecnologías-Facultad de ciencias agroindustriales. Universidad del Quindío. Pág. 108-111.
- Globocan, International Agency for Research on Cancer (2008) Breast cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008. Consultado desde: globocan.iarc.fr, el 24/09/13.
- Green M. y Sambrook J (2012) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 4a Edición. Vol. 1. Pág. 19-26.
- Hakoshima T (2005) Leucine Zippers. *Encyclopedia of life sciences*, John Wiley & Sons. Pág.1-5.
- Han J, Sabbatini P, White E. (1996) Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K. *Mol Cell Biol* (**16**):5857–5864.
- Hanahan Douglas y Weinberg Robert A. (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Leading Edge. *Cell* 144: R646-R674.
- Harbury P, et al. (1993) A switch between two-, three-, and four-stranded coiled coils in GCN4 leucine zipper mutants. *Science* (**262**): 1401–1407.
- Hedge R, Srinivasula S, Ahmad M, et al. (1998) Bik a BH3-containing mouse protein that interacts with Bcl-2 and Bcl-xL, is a potent death agonist. *J Biol Chem* 273: 7783-7786.
- Hinds MG, Smits C, Fredericks-Short R, et al. (2007) Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Nature Publishing Group* (**14**): 128-136.
- Ho W, et al. (2011) ChIP-chip versus ChIP-seq: Lessons for experimental design and data analysis. *BMC Genomics* (**12**): 134-146.
- Holliday Deborah L y Speirs Valerie (2011) Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research* 13: R215 (3-7)
- Human Breast Adenocarcinoma Cell Line (2013) MCF-7 Culturing Protocol. Consultado desde: www.mcf7_cell_culture.html, el: 24/09/13.
- Instituto Nacional del Cáncer (INC) (2015). El Cáncer; Cáncer de seno (mama), <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>, consultado el 06/07/15.
- International Agency for Research of Cancer (IARC) (2012). Breast Cancer, Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/breast-new.asp>, consultado el 07/07/15.
- King, Michael W. The medical biochemistry page, LLC. (2015). Consultado en: <http://themedicalbiochemistrypage.org/es/index.php>, el 02/09/2015.

- Klein U, Tu Y, Stolovitzky G, et al. (2003) Gene expression dynamics during germinal center transit in B cells. *Ann N Y Acad Sci* 987: 166-172.
- Kouskouti A y Kyrmizi I. (2005) Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay (PROT11). Epigenome Network. Consultado desde: www.epigenome-noe.net, el 14/09/2013.
- Krylov D y Vinson C. (2001) Leucine Zipper. *Encyclopedia of Life Science Group*, Nature Publishing Group. Pág. 1-7.
- Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Chipuk JE, Bonzon C, Sullivan BA, Green DR, et al. (2005) BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* (17):525–535.
- Lacey JV, et al. (2009) Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC Cancer* (9):84.
- Lal A, Haynes S y Gorospe M. (2005) “Clean western blot signals from immunoprecipitated samples”. *Mol Cell Probes*; 19(6): 385-388.
- Lanave C, Santamaria M, Saccone C. (2004) Comparative genomics: the evolutionary history of the Bcl-2 family. *Gene* (333):71–79.
- Lapidus R, et al. (1998) The loss of estrogen and progesterone receptor gene expression in human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* (1): 85-94.
- Lasfargues EY y Ozzello L. (1958) Cultivation of human breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst* (21): 1131-1147.
- Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. (2002) Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* (2):183–192.
- Levine B, Sinha S, and Kroemer G. (2008) Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. NIH Public Access, *Autophagy*; 4 (5): 600-606.
- Li H, et al. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the fas pathway of apoptosis. *Cell* (94): 491-501.
- Liang Z, et al. (2009) Involment of miR-326 in chemotherapy resistance of breast cancer through moulatng expression of multidrug resistance associated protein 1. *Biochemical Pharmacology* (79): 817-824)
- Lu Y, et al. (2006) A gene expression signature predicts survival of patients with stage I non-small cell lung cancer. *PLoS Med* (3): e467.

- Lüddecke S, et al. (2016) The putative oncogene CEP72 inhibits the mitotic function of BRCA1 and induces chromosomal instability. *Oncogene* (35): 2398-2406.
- Lüddecke S. (2015). *CEP72 represents a putative Oncogene that negatively regulates the mitotic function of BRCA1 and induces chromosomal instability* (Tesis de pregrado, doctoral). Recuperado de <https://ediss.uni-goettingen.de/handle/11858/00-1735-0000-0023-965A-C?locale-attribute=en>.
- Llorca C, Potschin M, y Zentgraf U. (2014) bZIPs and WRKYs: two large transcription factor families executing two different functional strategies. *Frontiers in Plant Science*; 169 (5): R1-R14.
- Lomonosova E y Chinnadurai G. (2008) BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. NIH Public Acces, *Oncogene*; 27 (Suppl 1): S2-19.
- Martínez-Carpio PA y Navarro MA. (2) El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama. *Rev Oncol* (4): 184-91.
- Martínez-Carpio PA y Navarro Moreno MA. (2003) El cultivo celular en la investigación básica del cáncer de mama. *Rev Oncol* 5 (4): 184-191.
- McDonnell, JM. (1999) Solution Structure of the proapoptotic molecule BID: A structural basis for apoptotic agonists and antagonists. *Cell*, (96): 625-634.
- McPherson J, et al. (2004) Lats2/Kpm is required for embryonic development, proliferation control and genomic integrity. *EMBO J* (18); 3677-3688.
- Molinolo A. (2003) Progestágenos y cáncer de mama: desarrollo de un modelo experimental. *Revista Química Viva*, Vol. 2, No.3.
- Munoz M, et al. (2007) Role of the MRP1/ABCC1 Multidrug transporter protein in cancer. *Life* (59):752-757.
- Scitable by Nature Education (2014) Transcription factors, definition. Consultado desde: <https://www.nature.com/scitable/definition/general-transcription-factor-transcription-factor-167>, el 17/12/18.
- Nashida N, et al. (2004) Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 2 are related closely to the prognosis of patients with ovarian carcinoma. *Cancer* (101): 1364-1374.
- Naoyuki F, et al. (2003) MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer. *Cell* (113): 207-219.

- Ning Z, et al. (2014) Molecular functions and significance of the MTA family in hormone-independent cancer. *Cancer Metastasis Rev* (33): 901-919.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) (2018) Cáncer de mama: prevención y control, <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/>, consultado el 06/07/15.
- Perou CM, et al. (2000) Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* (406): 474-752.
- Phillips T. y Hoopers L. (2008) Transcription factor and transcriptional control in eukaryotic cells. *Nature Education* (1): 119.
- Ritchie A, Gutierrez O y Fernández-Luna JL. (2009) PAR bZIP-bik is a novel transcriptional pathway that mediates oxidative stress-induced apoptosis in fibroblasts. *Cell Death and Differentiation* (16): 838-846.
- Seki T, et al. (2013) JosD1, a membrane-targeted deubiquitinating enzyme, is activated by ubiquitination and regulates membrane dynamics, cell motility and endocytosis. *Journal of biological chemistry* 24 (288):17145-17155.
- Schulte J, et al. (2010) DMob4/Phocein regulates synapse formation, axonal transport, and microtubule organization. *J Neurosci* (15): 5189-5203.
- Scitable (2014) Transcription factors. Nature Education, Cambridge MA, USA. Consultada desde: <http://www.nature.com/scitable/definition/general-transcription-factor-transcription-factor-167>, el 11/01/16.
- Shapiro I, et al. (2011) An EMT-Driven alternative splicing program occurs in human breast cancer and modulates cellular phenotype. *PLoS Genet* (7): 2218-2239.
- Slusarczyk A, et al. (2010) Structure and function of the perinucleolar compartment in cancer cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (75): 599-605.
- Sorlie T, et al. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* (98): 10869-10874.
- Sowter HM, et al. (2003) Expression of the cell death genes BNip3 and NIX in ductal carcinoma in situ of breast; correlation of BNip3 levels with necrosis and grade. *J Pathol* 201: 573-580.
- Sprouffske K, et al. (2012) Cancer in light of experimental evolution. *Curr Biol* 22 (17): R762-R771.
- St John M, et al. (1999) Mice deficient of Lats1 develop soft-tissue sarcomas, ovarian tumors and pituitary dysfunction. *Nature Genetics* (21): 182-186.
- Takagi K, et al. (2013) Amyloid precursor protein in human breast cancer: An androgen-induced gene associated with cell proliferation. *Cancer Sci* (104):1532-1538.

- Tari A, et al. (1999) Growth inhibition of breast cancer cells by Grb2 downregulation is correlated with inactivation of mitogen-activated protein kinase in EGFR, but not in Erb2, cells. *Oncogene* (18): 1325-1332.
- Toh Y, et al. (1997) Overexpression of the MTA1 gene in gastrointestinal carcinomas: correlation with invasion and metastasis. *Int J Cancer* (74): 459-463.
- Trejo-Vargas A, et al. (2015) Bik subcellular localization in response to oxidative stress induced by chemotherapy, in two different breast cancer cell lines and a non-tumorigenic epithelial cell line. *J Appl Toxicol.* (35):1262-1270.
- Troester MA, et al. (2004) Cell-type-specific responses to chemotherapeutics in breast cancer. *Cancer Res* (64): 4218-4226.
- UniProt (2002-20016) UniProtKB- Q13323 (BIK_HUMAN). Consultado desde: http://www.uniprot.org/uniprot/Q13323#family_and_domains, el 25/01/2016.
- Uribe Jorge R, et al. (2010) Clasificación molecular del cáncer de mama, y su correlación clínica. *Venez Oncol* 22 (2): R109-R116.
- Verna S, Zhao L, and Chinnadurai G. (2001) Phosphorylation of the Pro-apoptotic Protein BIK. *J Biol Chem* 276(7): 4671-4676.
- Viedma R, Baiza L, García A, Moreno L, Salamanca F, Arenas D. (2013) Suppression of the death gene BIK is a critical factor for resistance to tamoxifen in MCF-7 breast cancer cells. *Int J Oncol*; 43(6): 1777-1786.
- Weiquan Li, et al. (2011) Identification of a tumor suppressor relay between the FOXP3 and the hippo pathways in breast cancer and prostate cancers. *Cancer Research* (6): 2162-2171.
- Wingender E, Schoeps T y Dönitz J. (2012) TFClass: an expandable hierarchical classification of human transcription factors. *Nucleic Acids Research*, (41): 165-170.
- Xu L, et al. (1996) Attenuation of the expression of the focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells. *Cell Growth Differ* (7): 413-421.
- Zaret K, y Carrol J. (2011) Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes & Development* (25): 2227-2241.
- Zhou H, Zhang Y, Fu Y, Chan L and S. Lee A. (2011) A novel mechanism of Antiapoptotic function of 78-kDa Glucose-regulated Protein (GRP78). *J Biol Chem*; 286(29): 25687-25696.

XIV. APÉNDICE I

1. Preparación de Buffers necesarios para la metodología de ChiP

Debido a la diversidad de concentraciones finales usadas en la metodología de ChiP para los Buffer's requeridos, se señalan las concentraciones usadas de dichos reactivos en el presente trabajo.

ChiP Cell Lysis Buffer	Stock	Volumen por 1L
20 mM Tris-HCl pH 8.0	1 M	20 mL
85 mM KCl	3 M	28 mL
0.5% NP40	10 %	50 mL
ddH ₂ O		883 mL
Nuclei Lysis Buffer		
50 mM Tris-Cl pH 8.0	1 M	50 mL
10 mM EDTA	0.5 M	20 mL
1% SDS	10 %	100 mL
ddH ₂ O		830 mL
ChiP Dilution Buffer		
0.01% SDS	10 %	1 mL
1.1 % Triton X-100	10 %	110 mL
1.1 mM EDTA	0.5 M	2.2 mL
20 mM Tris-Cl pH 8.0	1 M	20 mL
167 mM NaCl	4 M	41.8 mL
ddH ₂ O		825 mL
Low Salt Wash Buffer		
0.1 % SDS	10 %	10 mL
1% Triton X-100	10 %	100 mL
2 mM EDTA	0.5 %	4 mL
20 mM Tris-Cl pH 8.0	1 M	20 mL
150 mM NaCl	4 M	37.5 mL
ddH ₂ O		828.5 mL

High Salt Wash Buffer	Stock	Volumen por 1L
0.1 % SDS	10 %	10 mL
1 % Triton X-100	10 %	100 mL
2 mM EDTA	0.5 M	4 mL
20 mM Tris pH 8.0	1 M	20 mL
500 mM NaCl	4 M	125 mL
ddH ₂ O		741 mL
LiCl Wash Buffer		
0.25 M / 0.5 LiCl	1 M	250 mL
1 % NP40	10 %	100 mL
1 % Deoxicolato		10 g
1mM EDTA	0.5 M	2 mL
20 mM Tris pH 8.0	1 M	20 mL
ddH ₂ O		~ 600 mL
Buffer TE		
10 mM Tris HCl pH 8.0	1 M	10 mL
1 mM EDTA	0.5 M	2 mL
Buffer ChIP Elution Reversión Crosslinking		
50 mM Tris pH 8.0	1M	
1 mM EDTA	16.7 mM	
1 % SDS	10 %	

XV. APÉNDICE II

1. Notas aclaratorias de la metodología de ChIP

1.1. Obtención de muestra a usar como control positivo para referencia en inmunoprecipitación de cromatina.

1.1.1. Extracción proteínas totales de tejido de cáncer de mama para estandarización de condiciones adecuadas para la inmunoprecipitación

Posteriormente, para el proceso de inmunoprecipitación, se notó la importancia del uso de buffers de recién preparación, y en especial el buffer usado en la reversión del cross-linking debió prepararse al momento de su uso. Cabe mencionar que otro paso donde se tuvo que implementar otra técnica para visualizar la correcta precipitación de la proteína BIK en la muestra de DNA de la línea celular que no se menciona en los protocolos de uso de la técnica, fue el uso de la proteína A acoplado a la proteína HRP (PA-HRP) como anticuerpo secundario para revelar el Western-Blot y confirmar la correcta inmunoprecipitación a partir de la muestra. Esto debido a que con un anticuerpo convencional anti-IgG (usado contra el anticuerpo primario), al usarlo tanto en la inmunoprecipitación como en el Western-Blot, la desnaturalización sufrida de este en el primer proceso durante la separación de uniones entre anticuerpos con la proteína, se dejan sitios de reconocimiento expuestos que al usarlo de nuevo como anticuerpo secundario en el Western Blot, reconoce los sitios desnaturalizados previamente incluidos en la membrana, impidiendo la visualización de la proteína de interés con señales falsas positivas, observándose solo dos bandas que representan las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos desnaturalizados. Para dicha problemática existen dos abordajes, uno el usar un tipo de anticuerpo distinto al que se usó en la inmunoprecipitación y el que se usó, el cual consiste en usar otro tipo de revelador para la parte final del Western-Blot: la PA-HRP, la cual sólo reconoce las moléculas de IgG intacta y no se une a las porciones kappa o lambda de las cadenas ligeras (LC) de un anticuerpo (Lal A, 2005). Por lo que en nuestro experimento se muestra con señal positiva en forma de banda solo a la señal dada por la proteína BIK inmunoprecipitada a partir de la muestra.

XVI. APÉNDICE III

1. Metodología de estandarización necesaria, aplicada entre los pasos 4 y 5 de la técnica de ChIP

1.1. Obtención de muestra a usar como control positivo para referencia en inmunoprecipitación de cromatina

1.1.1 Extracción proteínas totales de tejido de cáncer de mama para estandarización de condiciones adecuadas para la inmunoprecipitación

Para llevar a cabo una estandarización de las condiciones adecuadas para la inmunoprecipitación, se necesitaba de un homogeneizado de proteínas que contuviera a la proteína BIK, para poder probar el anticuerpo a usar en la técnica de ChIP. Por esta razón se utilizaron proteínas totales de tejidos de cáncer de mama en donde se buscó la presencia de BIK y usar dicho homogeneizado como control positivo en el Western Blot y la IP.

La extracción de proteínas totales a partir de tejido, se llevó a cabo agregando 700 µL de Buffer RIPA (Ripa 2X, EDTA 1 mM, SDS 0.2%, tritón 1%, antiproteolíticos 2% y agua bidestilada para el aforo). Se dejó la muestra en agitación moderada a 4°C durante 2 horas y posteriormente se centrifugó a 24.08 rfc por 5 minutos y se guardó el sobrenadante como proteínas totales (PT), agregando el 10% del volumen final de antiproteolíticos (Roche®).

Por último se cuantificó el extracto proteico por el método de Bradford por triplicado, se obtuvo un promedio de la concentración de proteína total y se hicieron alícuotas de 500 µg en tubos de 1.5 mL para evitar aplicar múltiples ciclos de congelación-descongelación a la muestra. Ya que este proceso mostró ser perjudicial para la concentración de la muestra a lo largo del tiempo.

1.1.2. Western Blot de BIK en proteínas totales de tejido de CaMa

Para el Western Blot de proteínas totales, se realizó una electroforesis de la muestra en geles de poliacrilamida al 20% (Poliacrilamida 20%, persulfato de amonio (APS) 10%, TEMED 0.06%, agua

bidestilada para el aforo). Se eligió esta concentración en base al tamaño de la proteína (16 KDa) y a la necesidad de una mejor resolución en el corrimiento para identificarla.

Se corrieron en los geles las muestras correspondientes, considerando también un marcador de peso molecular adecuado para identificar el tamaño de BIK. Las muestras se dejaron correr en Buffer de corrida (Tris-base, glicina, SDS 10%, agua bidestilada para el aforo, pH=8.3) a 200V durante una hora.

Posterior a la corrida, se llevó a cabo la electrotransferencia del gel a una membrana de PVDF (*polivinil difloruro*), previamente activada con metanol por 5 minutos y enjuagadas con agua destilada. La electrotransferencia se llevó a cabo a 4°C durante toda una noche.

Una vez se tuvieron las muestras transferidas a la membrana, se realizó un bloqueo de señal inespecífica con una solución de detergente Tween y leche baja en grasa al 5 % a temperatura ambiente durante una hora. Posteriormente se realizaron tres lavados consecutivos de 5 minutos cada uno con TBS-Tween (TTBS) 1X (Tris-base, NaCl, Tween 20, pH=7.6). Para después llevar a incubar con el anticuerpo primario anti-BIK (Abcam®, IgG *ab52182*) con una dilución 1:100, en una solución de TTBS-Leche al 0.5 %. Dejando incubar a 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente se realizaron otros tres lavados de 5 minutos cada uno con TTBS. Al término de los lavados, se incubaron las membranas con anticuerpo secundario anti-conejo 1:10,000 acoplado a HRP (Ambam®, Ig) en TTBS durante una hora. Posteriormente se realizaron tres lavados de 10 minutos con TTBS y se dejaron las membranas en TBS 1X hasta el momento de su revelado.

El revelado de las membranas se realizó usando el Kit de Millipore® (Inmunoblot Western HRP), en un cassette para revelado fotográfico y placas radiográficas (Kodak®), en un cuarto oscuro a iluminación excepto por una luz roja de revelado fotográfico.

Los tiempos de revelado fueron variables para cada membrana en diversas repeticiones del mismo experimento, variando desde los 10 minutos de exposición, hasta una hora con treinta minutos, dependiendo de la membrana utilizada y su caducidad (BioRad, o Millipore) y la concentración de la muestra contenida en estas.

1.1.3. Inmunoprecipitación de BIK a partir de proteínas totales de tejido de CaMa; paso previo a la Inmunoprecipitación de cromatina

Como paso previo a la inmunoprecipitación de cromatina, se realizó una inmunoprecipitación usando el mismo protocolo a usar en la técnica de ChIP, pero usando el control positivo de presencia de BIK a las proteínas totales de tejido de CaMa como muestra.

El protocolo para el corrimiento de las muestras, electrotransferencia, Western Blot y revelado, fueron iguales al apartado anterior.

Sin embargo para el revelado de esta IP, fue crucial el uso de Proteína A acoplada a HRP como señal secundaria en el revelado, debido a que esta no interfería con la señal del anticuerpo primario. Encontrándose que la concentración óptima a utilizar de esta proteína es con una dilución de 1:15,000, con el mismo protocolo de lavados mencionado en el apartado anterior, obteniéndose buenos resultados.