



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE
BIOMEDICINA MOLECULAR**

**“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
DEL PROMOTOR DEL GEN DE LA VARIANTE
DE HISTONA H2A.Z.2”**

T E S I S

Que presenta

LAQB. ROXANA ESMERALDA DELGADO PÉREZ

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

BIOMEDICINA MOLECULAR

DIRECTORA DE LA TESIS:

DRA. ROSAURA HERNÁNDEZ RIVAS

ASESORES:

DRA. REBECA GEORGINA MANNING CELA

Departamento de Biomedicina Molecular

DR. NICOLÁS VILLEGAS SEPÚLVEDA

Departamento de Biomedicina Molecular

DR. JOSÉ EFRAIN GARRIDO GUERRERO

Departamento de Genética y Biología Molecular

**Esta tesis fue realizada en el Departamento de Biomedicina Molecular del
Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico
Nacional, bajo la dirección de la Dra. Rosaura Hernández Rivas.**

**AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT-MÉXICO) LE
AGRADEZCO ESPECIALMENTE POR LA BECA RECIBIDA DURANTE LA
REALIZACIÓN DE LA MAESTRÍA**

REGISTRO: 632394

DEDICATORIAS

Agradezco profundamente

A mi papá Francisco Javier y mi mamá Rosa Ana

Quienes siempre me han apoyado y los amo infinitamente

A mis hermanos Paco, Pepe, Reynaldo y Luis que los quiero mucho

A mi novio Mario por sus consejos, apoyo incondicional y todos los momentos fantásticos

A Mariannela por ser mi amiga, por las risas y todos los momentos compartidos

A todos mis compañeros y amigos que integran el laboratorio Pedro, Lissuly Isabel, Maricela, Dany y especialmente a David quien ha sido un gran amigo y compañero en esta travesía, gracias por las risas y hacer de este un lugar más ameno.

Agradezco a mi comité integrado por los doctores Rebeca Georgina Manning Cela, Nicolás Villegas Sepúlveda, José Efraín Garrido Guerrero, por las críticas al trabajo, su ayuda técnica y discusión científica.

Agradezco a mi directora de tesis la Dra. Rosaura Hernández Rivas por haberme aceptado en su laboratorio, por todo el conocimiento brindado, la discusión científica, por su apoyo, paciencia, tiempo y dedicación.

RESUMEN

Se han identificado dos genes que codifican para la variante de histona H2A.Z, los cuales son H2A.Z.1 y H2A.Z.2. Esta histona ha sido la más estudiada de las variantes de la histona canónica H2A por los múltiples procesos celulares en los que participa, tales como la memoria epigenética, reparación del ADN, formación de heterocromatina y regulación transcripcional. Debido a que no se han estudiado los mecanismos moleculares que regulan la expresión del gen H2A.Z.2, la finalidad de este trabajo consistió en identificar y caracterizar el promotor del gen H2A.Z.2.

Con el propósito de localizar el promotor H2A.Z.2 inicialmente determinamos la ubicación del sitio de inicio de la transcripción. Para lo cual, buscamos la presencia de varias marcas de histonas como la H3K4me3, H3K9ac y H3K27ac en el extremo 5' del gen H2A.Z.2. Esto nos permitió establecer una probable región de 438 pb río arriba del ATG donde posiblemente estaba situado el TSS. Posteriormente mediante la técnica de RACE 5' logramos determinar que el TSS corresponde a una guanina ubicada a 292 pb río arriba del ATG, donde esta guanina podría estar dentro de un *core motif* tipo "Inr". Mediante ensayos de gen reportero logramos demostrar que la región de 1221 pb localizada río arriba del TSS funciona como un promotor. Además el análisis de deleciones de esta región nos permitió identificar la ubicación del promotor mínimo así como la localización y probable función de dos elementos regulatorio *upstream*. Estos resultados, junto con el análisis bio informático para la búsqueda de los probables sitios de unión a FT sugieren que el promotor mínimo está localizado río abajo del TSS, y no contiene *core motifs* ubicados río arriba del TSS como una caja TATA. Por lo que el promotor de H2A.Z.2 sería un promotor "TATA less". Respecto a los elementos regulatorios *upstream*, nuestros resultados indican la presencia de elementos en *cis* con una función activadora en la transcripción en la región de -715 a -219. Mientras que en la región de -218 a -74 probablemente existen elementos en *cis* con un función represora. Adicionalmente con la ayuda del análisis bio informático identificamos 6 sitios de unión para los factores de transcripción SOX que se podrían unir a la región de -715 a -219, y mediante ensayos de gen reportero en los que se utilizó una construcción con los sitios para SOX mutados nos permitió determinar que estos FT no son capaces de controlar la expresión del gen H2A.Z.2.

Finalmente, al realizar una comparación entre los elementos en *cis* y los factores en *trans* que reconocen y se unen a los promotores de los genes H2A.Z.1 y H2A.Z.2 encontramos que éstos son diferentes, ya que el promotor de H2A.Z.1 a diferencia de H2A.Z.2 contiene una caja TATA. Además ambos promotores están constituido por diferentes elementos en *cis*, sugiriendo que diferentes factores de transcripción podrían regular el encendido y apagado de ambos genes.

ABSTRACT

Two genes encoding the histone variant H2A.Z have been identified, these are H2A.Z.1 and H2A.Z.2. This histone has been the most studied of the canonical histone H2A variants due to the multiple cellular processes in which it participates, such as epigenetic memory, DNA repair, heterochromatin formation, and transcriptional regulation. Nevertheless, the molecular mechanisms that regulate the expression of the H2A.Z.2 gene have not been studied. So the purpose of this work was to identify and characterize the H2A.Z.2 gene promoter.

To locate the H2A.Z.2 promoter we initially determined the location of the transcription start site. For which, we searched for the presence of several histone modifications such as H3K4me3, H3K9ac, and H3K27ac at the 5'-end of the H2A.Z.2 gene. This allowed us to establish a probable region of 438 bp upstream of the ATG where the TSS was possibly located. Subsequently, using the RACE 5' technique, we were able to determine that the TSS corresponds to a guanine located at 292 bp upstream of the ATG, where this guanine could be inside in a *Inr-like* core motif. Through reporter gene assays we were able to demonstrate that the 1221 bp region located upstream of the TSS functions as a promoter. Besides, the analysis of deletions from this region allowed us to identify the location of the core promoter as well as the location and probable function of two upstream regulatory elements. These results, together with the bio-computer analysis for the search of the probable FT binding sites, suggest that the core promoter is located downstream of the TSS, and does not contain core motifs located upstream of the TSS as a TATA box. So the H2A.Z.2 promoter would be a "TATA-less" promoter. Regarding the upstream regulatory elements, our results indicate the presence of elements in *cis* with an activating function in the transcription in the region of -715 to -219. While in the region of -218 to -74 probably there are elements in *cis* with a repressor function. Additionally, with the help of the computer-based analysis, we identified 6 binding sites for the SOX transcription factors that could be linked to the region of -715 to -219, and by reporter gene assays in which a construction was used with the sites for mutated SOX allowed us to determine that these FT are not able to control the expression of the H2A.Z.2 gene.

Finally, when making a comparison between the elements in *cis* and *trans* factors that recognize and bind to the promoters of the genes H2A.Z.1 and H2A.Z.2 we find that these are different since the H2A.Z.1 promoter, unlike H2A.Z.2, contains a TATA box. Also, both promoters are constituted by different *cis* elements, suggesting that different transcription factors could regulate the switching on and off of both genes.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	1
ÍNDICE DE TABLAS	2
LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
CAPÍTULO I	4
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Anatomía del páncreas.....	4
1.2 Importancia clínica del cáncer.....	5
1.2.1 Signos y Síntomas asociados a ACDP	7
1.3 Factores de riesgo asociados al ACDP	9
1.3.1 Riesgos fijos	9
1.3.2 Riesgos modificables	10
1.3.3 Riesgos genéticos	12
1.4 Lesiones precursoras en cáncer pancreático	13
1.4.1 PanIN	13
1.4.2 IPMN.....	14
1.4.3 MCN.....	15
1.5 Mecanismos moleculares en la patogénesis del ACDP	16
1.5.1 Alteraciones genéticas	17
1.5.1.1 Activación de oncogenes.....	17
1.5.1.2 Inactivación de genes supresores de tumores.....	19
1.5.2 Mecanismos epigenéticos involucrados en el desarrollo del ACDP.....	23
1.5.2.1 Modificaciones epigenéticas	23
1.5.2.2 Modificaciones epigenéticas a nivel de ADN: Metilación de ADN.....	24
1.5.2.3 Modificaciones epigenéticas a nivel de la cromatina: Modificaciones post traduccionales de histonas (PTMs)	28
1.5.2.4 Modificaciones post-traduccionales en el ACDP.....	31
1.5.2.5 ARN no codificantes	34
1.5.2.6 miRNAs y ACDP	34

1.5.2.7 ARN largos no codificantes.....	37
1.5.2.8 ARN largos no codificantes y ACDP.....	37
1.5.2.9 Arquitectura nuclear	39
1.5.2.10 Variantes de Histonas.....	40
1.5.2.11 MacroH2A	41
1.5.2.12 H2A.Z.....	41
1.6 Funciones de H2A.Z.....	42
1.7 H2A.Z: una variante de histona oncogénica.....	44
1.8 H2AZ y ACDP.....	47
2. JUSTIFICACIÓN.....	51
3. HIPÓTESIS	52
4. OBJETIVOS	53
4.1 Objetivo General.	53
4.2 Objetivos Particulares	53
CAPÍTULO II	55
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
5.1 Cultivo de células PANC-1	55
5.1.1 Pase de cultivo y crio preservación de células PANC-1	56
5.1.2 Sub cultivo de la línea celular PANC-1.....	56
5.2 Extracción de ADN genómico	57
5.2.1 Electroforesis en gel de agarosa	58
5.3 Extracción del ARN total.....	59
5.3.1 Tratamiento con ADNasa I	60
5.3.2 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	61
5.3.3 Electroforesis de ARN en gel de agarosa desnaturalizante.....	63
5.4 Retro-transcripción reversa del ARN.....	64
5.5 Análisis <i>in silico</i> para la búsqueda de marcas epigenéticas	65
5.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el mapeo del extremo 5' del ADN	65
5.7 Amplificación rápida del extremo 5' del ADNc (RACE 5')	67
5.7.1 Síntesis de ADNc oligo específico	67
5.7.2 Adición del tracto homopolimérico de citosinas	69
5.7.3 PCR del ADNc- dCTPs-3'	69

5.7.4 PCR anidada.....	70
5.8 Secuenciación del producto RACE 5´	70
5.9 Amplificación del promotor de H2A.Z.2.....	70
5.9.1 Amplificación de sub fragmentos de la región F-1500 del promotor del gen H2A.Z.2....	71
5.9.2 Purificación de los productos de PCR a partir de gel de agarosa.....	75
5.10 Clonación de los fragmentos del promotor	76
5.10.1 Ligación de los insertos en los plásmidos pGEM-T y pJET 1.2.....	77
5.10.2 Transformación de las células competentes.....	79
5.11 PCR de colonia.....	81
5.12 Extracción del ADN plasmídico.....	82
5.13 Digestión de las construcciones pGEM-T-1000/500 y pJET 1.2-1500	84
5.14 Doble digestión con las enzimas de restricción KPN I y HIND III.....	85
5.15 Clonación y sub clonación en el vector pGL3-Basic	85
5.15. 1 Digestión del plásmido pGL3-Basic	85
5.15.2 Ligación de los fragmentos al vector pGL3-Basic.....	86
5.16 Transformación de las bacterias competentes	86
5.17 PCR de colonia.....	86
5.18 Extracción del ADN plasmídico.....	87
5.19 Digestión de las construcciones pGL3-Basic-promotor H2A.Z.2	87
5.20 Secuenciación de las construcciones pGL3-Basic.....	88
5.21 Transfección transitoria de las células PANC-1	88
5.22 Ensayo de gen reportero luciferasa	90
5.23 Análisis <i>in silico</i> para la predicción de sitios de unión a factores de transcripción.....	91
CAPÍTULO III	93
6. Resultados	93
6.1 Determinación del sitio de inicio de la transcripción (TSS).....	93
6.2 El probable TSS está localizado en la región comprendida entre 309 y 289 pb río arriba del ATG.....	95
6. 3 Amplificación de 1421 pb de la región <i>upstream</i> del gen H2A.Z.2	101
6.4 Obtención de la construcción pGL3-1500.....	105
6.5 Secuenciación de la construcción pGL3-basic.....	106
6.6 La región de 1421 pb es capaz de activar la transcripción.....	107

6.7 Caracterización funcional del promotor del gen H2A.Z.2 mediante un análisis de deleciones	108
6.8 Generación de las construcciones pGL3-1000/500/250/200 y 113.....	109
6.9 La región ubicada entre 715 y 218 pb río arriba del TSS contiene elementos en <i>cis</i> activadores de la transcripción	112
6.10 El análisis <i>in silico</i> para los sitios de unión a factores de transcripción revela múltiples motivos de unión para los factores de transcripción SOX.	116
6.11 Generación de construcciones pGL3-SOXmut /SOXwt	117
CAPÍTULO IV	121
DISCUSIÓN.....	121
El promotor del gen H2A.Z.2 tiene una transcripción “focused” y posee un <i>core motif</i> tipo Inr en el cual está contenido el TSS.	121
El promotor mínimo del gen H2A.Z.2 está localizado a 88 pb río abajo del TSS y se trata de un promotor “TATA-less”	124
El promotor del gen H2A.Z.2 contiene probables elementos en <i>cis</i> en la región comprendida entre -218 a -74 que podrían reclutar proteínas represoras de la transcripción	126
El promotor del gen H2A.Z.2 contiene elementos en <i>cis</i> ubicados en la posición de -715 a -219 que podrían reclutar proteínas activadoras de la transcripción.....	127
Los promotores de los genes H2A.Z.1 y H2A.Z.2 están constituidos por diferentes elementos en <i>cis</i>	130
CONCLUSIONES	133
PERSPECTIVAS	134
BIBLIOGRAFÍA.....	135
ANEXOS	141
Anexo 1.....	141
Anexo 2.....	142
Anexo 3.....	145

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Anatomía del Páncreas.....	5
Figura 2 Modelo de la progresión del ADCP y los cambios moleculares asociados al ADCP.....	16
Figura 3 Genes que se encuentran alterados en el ADCP	22
Figura 4. Alineamiento de las isoformas de variante de histonas H2A.Z.	44
Figura 5. Niveles de expresión de las isoformas de H2AZ.	48
Figura 6 Diagrama del análisis in silico de los promotores H2A.Z.1 y H2A.Z.2.	50
Figura 7 Oligos empleados para amplificar parte del promotor de KRAS	62
Figura 8 Localización de los oligonucleótidos utilizados para el mapeo del TSS.	66
Figura 9 Localización de oligos gen específico empleados en el RACE 5´	68
Figura 10 Ubicación de los oligos utilizados en la amplificación del promotor del gen H2A.Z.2.....	72
Figura 11 Vectores utilizados para la clonación de los fragmentos del promotor.....	77
Figura 12 Estrategia de clonación utilizando el vector pGEM-T	79
Figura 13 Vector pGL3-Basic y pRL-SV40.	90
Figura 14 Análisis bio informático para la búsqueda de marcas de histonas.	94
Figura 15 Integridad del ARN de la línea celular PANC-1	95
Figura 16 Secuencia correspondiente a los 438 pb en donde probablemente este localizado el TSS	97
Figura 17 Estrategia utilizada para el mapeo de la región 5´UTR del gen H2A.Z.2.	97
Figura 18 Localización del oligo gen específico empleado para la síntesis del ADNc.....	99
Figura 19 Esquema de la técnica RACE 5´	100
Figura 20 El sitio de inicio de la transcripción se ubica a 292 pb río arriba del ATG	101
Figura 21 Fragmento de 1421 pb de la región upstream del gen H2A.Z.2.....	102
Figura 22 Identificación de las colonias recombinantes mediante PCR de colonia.	103
Figura 23 Digestión del plásmido pJET 1.2 -1500.....	104
Figura 24 Generación de la construcción pGL3-1500.....	106
Figura 25 El fragmento de 1421 pb de la región upstream del gen H2A.Z.2 es capaz de conducir la expresión del gen de la luciferasa.....	108
Figura 26 A-B Localización de los oligos empleados para amplificar cada uno de los fragmentos del promotor de H2A.Z.2.....	110
Figura 27 Fragmentos amplificados de 918, 415, 273, 196 y 113 pb.	111
Figura 28 Digestión de las construcciones pGL3-1000/500/250/200/113 con las enzimas de restricción Kpn I Hind III.....	112
Figura 29 Caracterización funcional del promotor del gen H2A.Z.2.	114
Figura 30 Generación de la construcción pGL3-1221.	115
Figura 31 El promotor del gen H2A.Z.2 es un promotor “bipartito”	116
Figura 32 Esquema de los probables sitios de unión para los FTs presentes en el promotor H2A.Z.2	117
Figura 33 Digestión de las construcciones pGL3-SOXMut/SOXWT.	119
Figura 34 Los sitio SOX ubicados entre las posiciones -570 a -502 no regulan positivamente la actividad transcripcional del promotor.....	120
Figura 35 Diagrama de los probables sitios de unión para factores de transcripción (FTs) presentes en el promotor del gen H2A.Z.1 y H2A.Z.2	132

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Componentes de la reacción de PCR.....	61
Tabla 2 Oligos empleados en la reacciones de PCR para el mapeo del TSS	66
Tabla 3 Oligos utilizados en la técnica RACE 5'	68
Tabla 4 Secuencias de los oligonucleótidos sentido y anti sentido utilizados para la amplificación del promotor del gen H2AZ.2.	72
Tabla 5 Genotipo de las células E. coli XL-10 Gold y Top 10.....	80
Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en la PCR de colonia.	82
Tabla 7 Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de cada una de las construcciones en el vector pGL3-Basic.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

ACDP	Adenocarcinoma ductal pancreático
ADNc	AND complementario
AP-1	Factor activador 1
ARNnc	ARN no codificantes
CP	Cancer de pancreas
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta del AMPc
DNMT	AND metiltransferasas
EMT	Transición epitelio mesénquima
FT	Factor de transcripción
HAT	Histona acetil transferasa
HDAC	Histonas deacetilasas
HMT	Hsitona metiltransferasa
IPMN	Neoplasia Intraductal papilar mucinosa
MCN	Neoplasma quístico mucinoso
PTM	Modificaciones post traduccionales
PanIN	Neoplasia intraepitelial pancreática
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RACE 5´	Amplificación rápida del extremo 5´ del ADNc
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
WT	Wild type

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Anatomía del páncreas

El páncreas es un órgano glandular alargado que se extiende casi en sentido transversal sobre la pared abdominal, desde el duodeno hasta el bazo y está conectado al hígado, bazo e intestino delgado. Anatómicamente el páncreas se divide en cuatro porciones: cabeza, cuello, cuerpo y cola (Figura 1B) y se considera un órgano mixto ya que está constituido tanto por tejido endocrino como por tejido exocrino (Figura 1A)(Jouvet & Estall, 2017). El tejido endocrino representa alrededor del 2% de la masa de este órgano y está compuesto por los islotes de Langerhans los cuales contienen cinco tipos de células distintas: las α , β , δ , ϵ y γ (células PP) las cuales secretan glucagón, insulina, somatostatina, grelina y péptido pancreático respectivamente (Figura 1B). En lo que respecta al tejido exocrino representa alrededor del 98% de la masa pancreática y su función principal es la de sintetizar y secretar enzimas digestivas (Jouvet & Estall, 2017). El tejido exocrino está formado por cuatro tipos células: 1) las células acinares, 2) las células ductales, 3) las células centro acinares y 4) las células estrelladas pancreáticas (Pandol, 2010). Las células acinares forman los acinos pancreáticos y junto con sus ductos drenantes constituyen la unidad funcional del tejido exocrino. Estas células están especializadas en sintetizar, almacenar y secretar enzimas digestivas (Pandol, 2010). Las células ductales forman el epitelio de los ductos drenantes. Mientras que las células centro-acinares están situadas en la unión del acino y el ducto, estas células tienen las características de una célula ductal pero probablemente sea una célula progenitora para diferentes tipos de células del páncreas. (Pandol, 2010). Finalmente las células estrelladas pancreáticas tienen la función de establecer la membrana basal para dirigir la formación de las estructuras epiteliales. Sin embargo, en condiciones patológicas (como el cáncer)

las células estrelladas son transformadas a un tipo celular miofibroblasto proliferante que secreta proteínas de matriz extracelular, citocinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento (Pandol, 2010).

Debido a la importante función que desempeña este órgano, alteraciones en el mismo llegan a repercutir gravemente en la homeostasis del organismo y conducir al desarrollo de enfermedades como la diabetes mellitus, la pancreatitis y cáncer de páncreas.

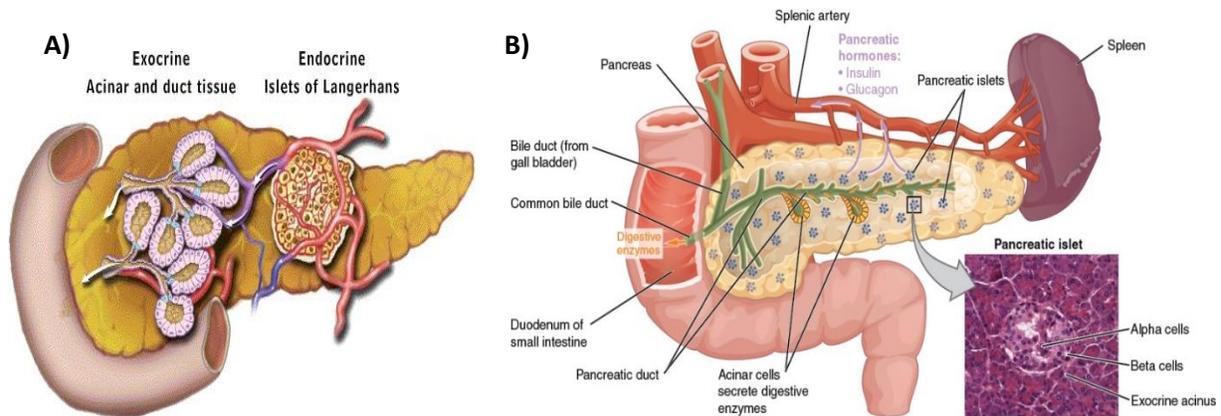


Figura 1 Anatomía del Páncreas.

A) El páncreas es un órgano mixto constituido por tejido exocrino (acinos y ductos) y tejido endócrino (islotos de Langerhans). La porción exocrina secreta enzimas digestivas, agua y NaHCO_3 dentro del duodeno mientras que la porción endocrina secreta hormonas al corriente sanguíneo. **B)** Tipos de células pancreáticas. Las células acinares forman los acinos, los cuales son la unidad funcional del tejido exocrino del páncreas, mientras que las células ductales y las células centro acinares son células secretoras de bicarbonato. (Tomado de Pandol, SJ., 2010.)

1.2 Importancia clínica del cáncer

El cáncer pancreático (CP) representa la séptima causa más común de muerte asociada a cáncer alrededor del mundo. El CP causa más de 330,000 muertes por año, siendo los países desarrollados los que presentan una mayor tasa de incidencia (Simoies, Olson, Saldia, & Kurtz,

2017). Debido a que el páncreas es un órgano mixto se generan dos tipos de tumores: 1) los tumores endocrinos pancreáticos, los cuales tienen su origen en las células endocrinas y representan menos del 5% de todos los casos cáncer de páncreas y 2) los tumores exocrinos que tienen su origen en las células exocrinas del páncreas y representan aproximadamente el 95% de los cánceres pancreáticos(Ilic & Ilic, 2016).

El tipo de tumor pancreático exocrino más común es el adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP) y constituye el 90% de todos los casos de tumores exocrinos (Simoes et al., 2017). El ACDP se origina a partir de las células ductales y puede desarrollarse en cualquier porción del páncreas, siendo la cabeza del páncreas la porción donde se origina con mayor frecuencia. El ACDP representa el 12^{avo} tipo de cáncer más común a nivel mundial, aun cuando las tasas de incidencia varían de 7.4 en Estados Unidos de América a 1 en regiones de África y sudeste de Asia por cada 100,000 habitantes. Respecto a la incidencia del ACDP por género, la incidencia es más alta en hombres que en mujeres con tasas de 4.9 y 3.6 por cada 100, 000 habitantes respectivamente (Ho et al., 2019; Simoes et al., 2017).

A pesar de no tener una incidencia comparable con la de otros tipos de cáncer, la tasa de mortalidad del ACDP se mantiene como la más alta entre todos los tipos de cáncer con una supervivencia promedio de 6 meses al momento del diagnóstico y una supervivencia a 5 años menor al 8%(Ho et al., 2019). Se estima que de continuar la tendencia como hasta ahora para el año 2030 el ACDP será la segunda causa de mortalidad por cáncer a nivel mundial (Rahib et al., 2014).

La baja tasa de supervivencia que presenta el ACDP se debe a que el diagnóstico de este tipo de cáncer (en el 52% de los casos) se realiza en etapas avanzadas de la enfermedad (cuando el cáncer

ya se ha diseminado y creado metástasis). Respecto a lo anterior la ausencia de síntomas específicos aunado a la falta de biomarcadores lo suficientemente sensibles y específicos para realizar el diagnóstico de la enfermedad son las principales causas de que el diagnóstico se realice en etapas tardías. La detección del ACDP en etapas tempranas es crucial ya que es en esta etapa cuando la resección quirúrgica del tumor representa la única opción de tratamiento potencialmente curativa para los pacientes. Sin embargo solamente del 15-20% de los pacientes diagnosticados con ACDP son candidatos para que se realice la pancreatometomía. No obstante aun en esas circunstancias la tasa de supervivencia para estos pacientes a 5 años se mantiene por debajo del 20% incluso con quimioterapia adyuvante (Ho et al., 2019; Iguchi, Safgren, Marks, Olson, & Fernandez-Zapico, 2016).

Otro factor que impacta en la agresividad del ACDP, es que es un tumor altamente resistente a la quimioterapia convencional y a la radiación. Actualmente la gemcitabina es la opción más empleada para el tratamiento del ACDP. Sin embargo, su empleo no ha mostrado aportar un beneficio a la supervivencia de estos pacientes, y aunque numerosos estudios clínicos han intentado mejorar este tratamiento probando combinaciones con otros agentes quimioterapéuticos no se han obtenido resultados prometedores, por lo que existe una urgente necesidad en desarrollar nuevas terapias que estén dirigidas específicamente a las vías alteradas que son más relevantes en la patobiología del ACDP (Lomberk & Urrutia, 2015).

1.2.1 Signos y Síntomas asociados a ACDP

El hecho de que el diagnóstico del ACDP se realice en el 52% de los casos en etapas avanzadas de la enfermedad, cuando la mayoría de las veces ya ha iniciado el proceso metastásico, refleja la falta de signos y síntomas clínicos específicos debido en parte a la

localización anatómica del páncreas y la infiltración a órganos circundantes (Guillén-Ponce et al., 2017). Los síntomas que son frecuentemente asociados al ACDP incluyen ictericia, astenia, anorexia, pérdida de peso, dolor abdominal y coluria, todos estos síntomas no son específicos a excepción de la ictericia(Guillén-Ponce et al., 2017).

La ictericia se manifiesta por una coloración amarilla en la piel y en los ojos, y es causada por una acumulación de bilirrubina. Normalmente el hígado excreta bilirrubina como parte de la bilis, esta secreción pasa a través del conducto colédoco hacia los intestinos donde funciona como emulsionante de los ácidos grasos(Guillén-Ponce et al., 2017). Cuando el colédoco se obstruye la bilis no puede llegar hasta los intestinos ocasionando que la bilirrubina se acumule en el cuerpo. Cuando el crecimiento tumoral se origina en la cabeza del páncreas, lo cual ocurre en el 60- 70% de los casos, el tumor puede oprimir el conducto obstruyendo el paso de la bilis cuando aún es pequeño, dando lugar a que sea detectado en etapas iniciales. Sin embargo el cáncer que se origina en el cuerpo y cola del páncreas (en el 20 - 25% de los casos), no ejerce presión en el conducto sino hasta que se encuentra propagado por todo el órgano lo que hace que sea detectado en etapas tardías(Guillén-Ponce et al., 2017). Sin embargo, el ACDP no es la causa más común de ictericia, ya que trastornos inflamatorios del hígado como la hepatitis y los cálculos biliares son los que más frecuentemente producen ictericia. En contraste, pacientes en etapas avanzadas de ACDP pueden tener una masa epigástrica palpable, hepatomegalia debido a metástasis al hígado, ascitis debido a una carcinomatosis peritoneal y dolor severo causado por infiltración nerviosa y vascular (Guillén-Ponce et al., 2017). Por lo que, por todo lo anteriormente expuesto, se hace inminente realizar un diagnóstico temprano que permita detectar la enfermedad en sus etapas iniciales, lo que evitaría que la sobrevida del paciente se reduzca debido a la propagación del tumor.

Actualmente, en la clínica se cuenta con tres herramientas de diagnóstico, las cuales, además de detectar la presencia del tumor, ayudan a la estadificación de la enfermedad. Los tres métodos de diagnóstico son: a) los estudios de imagenología, los cuales son importantes para la detección de la masa tumoral; b) los estudios de laboratorio que se encargan de detectar marcadores tumorales en muestras biológicas como sangre y jugo pancreático; y finalmente, c) los estudios histológicos realizados en biopsias del tejido canceroso, los cuales confirman los dos estudios anteriores, razón por la cual es considerado como el estándar de oro para el diagnóstico del cáncer de páncreas (American Cancer Society, 2015; Hezel A., *et al.*, 2006; Vincent A., *et al.* 2011). Sin embargo, estos métodos de diagnóstico convencionales no tienen la suficiente sensibilidad ni especificidad para detectar al ACDP en estadios tempranos, por lo que el estudio e identificación de nuevas herramientas diagnósticas es un área que actualmente está en desarrollo, principalmente para la identificación de biomarcadores específicos para esta enfermedad (Simoes *et al.*, 2017).

1.3 Factores de riesgo asociados al ACDP

Las causas exactas que conducen al inicio del ACDP se desconocen, pero algunos factores como el sexo, edad, y factores modificables como fumar, obesidad, diabetes y ciertas actividades ocupacionales incrementan la probabilidad de desarrollar este tipo de cáncer (Simoes *et al.*, 2017).

1.3.1 Riesgos fijos

Se han reportado factores de riesgo fijos asociados al cáncer pancreático, entre ellos es el sexo, siendo más común el ACDP en hombres que en mujeres, con tasas de incidencia global de 4.9 y 3.6 por cada 100,000 habitantes para hombres y mujeres respectivamente. En el 2012 aproximadamente 178,000 hombres fueron diagnosticados con ACDP

en comparación con 160,000 mujeres. En este caso las diferencias en las tasas de incidencias pueden ser atribuidas a los estilos de vida y hábitos como el consumo de tabaco, alcohol, la actividad ocupacional entre otros(Simoes et al., 2017; Wörmann & Algül, 2013).

Otro factor fijo que contribuye al desarrollo del ACDP es la edad, el riesgo de desarrollar cáncer pancreático es relativamente bajo en personas menores de 40 años sin embargo las tasas de incidencia aumentan progresivamente conforme aumenta la edad de los individuos, pudiendo incrementarse hasta en 100 veces la tasa de incidencia en individuos mayores a 85 años con respecto a los individuos menores de 40 años. Además la edad promedio al momento del diagnóstico de ACDP es de 73 años lo cual indica que los individuos de edad avanzada son más susceptibles a desarrollar esta enfermedad (Wörmann & Algül, 2013).

1.3.2 Riesgos modificables

Existe una fuerte asociación entre fumar y desarrollar ACDP. El tabaco es una mezcla compleja que contiene al menos 50 carcinógenos conocidos los cuales probablemente inicien y faciliten el desarrollo de los tumores pancreáticos. Se estima que fumar incrementa al doble el riesgo de desarrollar cáncer pancreático, además éste se ve incrementado proporcionalmente con el número de cigarros fumados por día y los años en que se ha fumado. De tal manera que el riesgo para aquellos individuos que fuman más de 35 cigarros por día es 3 veces mayor comparado con el riesgo de los no fumadores, y el riesgo para aquellos que han fumado por más de 30 años el riesgo se incrementa a más del doble. Estudios de casos control han mostrado que el riesgo para los exfumadores disminuye luego de 20 años de haber dejado de fumar teniendo un riesgo igual al de los que nunca han fumado(Simoes et al., 2017).

Otro factor de riesgo para el ACDP potencialmente modificable es el índice de masa corporal (IMC). Un mecanismo propuesto que explica el incremento del riesgo en personas con un IMC alto es la resistencia a la insulina, esto lleva a una mayor secreción de insulina resultando en hiperinsulinemia y en un incremento de los niveles del factor de crecimiento insulínico (IGF-1), el cual inhibe la apoptosis y promueve el desarrollo de tumores pancreáticos (Simoes et al., 2017).

La diabetes mellitus (DM) también ha sido asociada con claro si la diabetes juega un papel causativo en el desarrollo de esta enfermedad o si es una manifestación temprana del cáncer pancreático. El mecanismo por el cual se explica la contribución de la DM al desarrollo del cáncer ya se ha descrito antes en el IMC como factor de riesgo modificable. Además se ha establecido que el riesgo de desarrollar ACDP es más elevado para aquellos pacientes con una diabetes de corta duración, de 1 a 4 años, mientras que el riesgo disminuye considerablemente en aquellos pacientes con una diabetes de duración más larga de 5 -9 años y para aquellos con diabetes de más de 10 años el riesgo disminuye aún más (Simoes et al., 2017).

Por último el consumo de alcohol es otro factor de riesgo para el desarrollo del ACDP y también puede ser modificable. Se ha establecido que un consumo de alcohol mayor a 24 g/día incrementa el riesgo de desarrollar ACDP en hombres. Esto se ha atribuido al hecho de que algunos metabolitos del alcohol como el acetaldehído pueden potenciar los efectos de otros carcinógenos como los contenidos en el tabaco. Aunado a lo anterior un consumo fuerte de alcohol puede causar pancreatitis crónica la cual también ha sido asociada con un mayor riesgo de desarrollar este cáncer (Simoes et al., 2017).

1.3.3 Riesgos genéticos

Aproximadamente del 5 al 10% de los casos de ACDP se presentan en pacientes con una historia familiar con este tipo de cáncer, y éstos se atribuyen a factores genéticos heredables. Clínicamente la predisposición hereditaria al cáncer pancreático es dividida en tres casos:

- 1) Síndromes de predisposición tumoral. Los cuales están asociados a mutaciones en genes de línea germinal, éstos se caracterizan por tener un fenotipo clínico diferente al cáncer pancreático. Ejemplos de estos síndromes incluyen el cáncer hereditario de mama y ovario, el Síndrome de Peutz-Jeghers (PJS), el melanoma múltiple atípico familiar (FAMMM), el síndrome de cáncer de melanoma pancreático, entre otros. Por ejemplo las mutaciones en el gen BRCA2, que están ligadas al cáncer de mama y ovario, son las más comúnmente encontradas en los casos de ACDP familiar y están asociadas con un riesgo de hasta tres veces a desarrollar este tipo de cáncer. Otras mutaciones que han sido identificadas en pacientes con una historia familiar de CP son en el gen supresor de tumores CDKN2A, BRCA1 y PALB2 (Raphael et al., 2017).
- 2) Pancreatitis hereditaria y fibrosis quística. La pancreatitis hereditaria está asociada a una mutación de línea germinal en el gen PRSS1 que codifica para el tripsinógeno catiónico, la consecuencia de esta mutación es un incremento de la conversión de tripsinógeno a tripsina, el incremento en la tripsina altera el balance de proteasas- anti proteasas induciendo pancreatitis, este trastorno inflamatorio incrementa 26 veces el riesgo comparado con la población en general de desarrollar cáncer pancreático (Ho et al., 2019; Khan et al., 2017).
- 3) Cáncer pancreático familiar (CPF), el cual se refiere a familias en las que más de dos miembros de primer grado (MPG) están afectados con adenocarcinoma pancreático y

no cumplen los criterios para incluirse en los síndromes de predisposición tumoral. El riesgo de padecer ACDP para la población general es del 1.3 a 1.5%, mientras que para individuos con una historia de cáncer familiar el riesgo se incrementa dos a tres veces más. Por ejemplo para individuos con dos MPG con ACDP el riesgo estimado es 6.4 veces mayor respecto al riesgo de la población general y para individuos con más de tres MPG con ACDP el riesgo se incrementa hasta 32 veces más (Wörmann & Algül, 2013).

1. 4 Lesiones precursoras en cáncer pancreático

Yachida (2010) sugiere que los cambios genéticos observados en el ACDP y metástasis toman casi 12 años desde la mutación inicial en el páncreas hasta el desarrollo de un ACDP invasivo. Es decir es un cáncer que pasa por lesiones pre-neoplásicas antes de considerarse un ACDP. Mediante estudios clínicos e histológicos se han identificado 3 lesiones precursoras del ACDP como son: la neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN), la neoplasia quística mucinosa (MCN) y la neoplasia intraductal papilar mucinosa (IPMN), de las cuales la PanIN es la más común.

1.4.1 PanIN

La lesión precursora más estudiada y que se encuentra en el 82% de los pacientes con ACDP es la neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN), la cual se localiza mayormente en la cabeza del páncreas(Hruban, Maitra, & Goggins, 2008). El PanIN es una lesión microscópica, usualmente menor a 0.5 cm que se originan en los ductos pancreáticos intralobulares pequeños, está compuesta de células columnares a cuboidales. Este tipo de lesión es clasificada de acuerdo al grado de atipia celular y nuclear en tres tipos de lesiones: 1) lesiones de bajo grado PanIN-1A/B, 2) lesiones de grado intermedio PanIN2 y 3) lesiones de grado alto PanIN-3. Esto ha conducido a que

el modelo de progresión propuesto para el cáncer pancreático sea un modelo multipasos, en el que el desarrollo de la neoplasia progresa linealmente de un epitelio normal primero a lesiones pre-neoplásicas hasta llegar a un ADCP (Hruban et al., 2008).

Histológicamente los PanIN-1 se componen de células epiteliales columnares con núcleos uniformes y redondos orientados basalmente, pueden ser aplanadas como en el PanIN-1A o papilares en el caso de PanIN-1B. Mientras que, las lesiones PanIN-2 presentan más cambios nucleares incluyendo la pérdida de la polaridad nuclear, aglomeración nuclear, pleomorfismo nuclear (variación en el tamaño del núcleo), hiperchromasia nuclear (abundancia de ADN que se tiñe de negro en preparaciones histológicas) y pseudoestratificación nuclear (Hruban et al., 2008). En el caso de las lesiones PanIN-3 también conocidas como carcinoma *in situ* muestran el más alto grado de displasia. Estas lesiones son arquitectónicamente complejas, formando papilas y estructuras cribiformes, las cuales se caracterizan por la presencia de orificios o perforaciones, y en algunos casos se encuentran grupos de células que brotan del epitelio en la luz del conducto. Citológicamente, los núcleos en las lesiones PanIN-3 son agrandados, pleomórficos y mal orientados, los nucléolos son a menudo figuras prominentes y mitóticas (Hruban et al., 2008).

1.4.2 IPMN

El ADCP aunque con una menor frecuencia también puede derivar de otro tipo de lesiones pre neoplásicas como la neoplasia intraductal papilar mucinosa (IPMNs) o de neoplasmas quísticos mucinosos (MCNs)(Iguchi et al., 2016). La lesión IPMN es un tipo de lesión macroscópica con un tamaño mayor a 1cm, son más grandes que las lesiones PanIN y por tanto más fáciles de detectar. La IPMN se originan dentro del ducto pancreático principal o de alguna de sus ramificaciones y está definida por una proliferación papilar del epitelio ductal por tanto tienden a tener un mayor

número de papilas mucinosas que las PanINs, y se caracteriza por la expresión de la mucina 2 (MUC2) cuya detección facilita el diagnóstico de una IPMN (Hruban et al., 2008).

1.4.3 MCN

La neoplasia mucinosa quística (MCN), son las lesiones pre-neoplásicas menos frecuentes. La prevalencia exacta de este tipo de lesión es difícil de estimar. Sin embargo, Valsangkar en 2012 reportó cerca de 23% of MCN en pacientes con tumores quísticos resecaados del páncreas. Estas lesiones se originan principalmente en mujeres y se localizan usualmente en el área que abarca del cuerpo del páncreas a la cola y no muestran comunicación con el sistema ductal pancreático. Histológicamente los MCN son lesiones quísticas que pueden crecer muy grandes. Presentan una superficie lisa y una pseudocápsula fibrosa de espesor variable y, a menudo, con calcificaciones. Microscópicamente, el revestimiento epitelial de una MCN consiste en células columnares con un grado variable de displasia (Diaferia et al., 2016; Distler, Aust, Weitz, Pilarsky, & Grützmann, 2014; Patra, Bardeesy, & Mizukami, 2017)

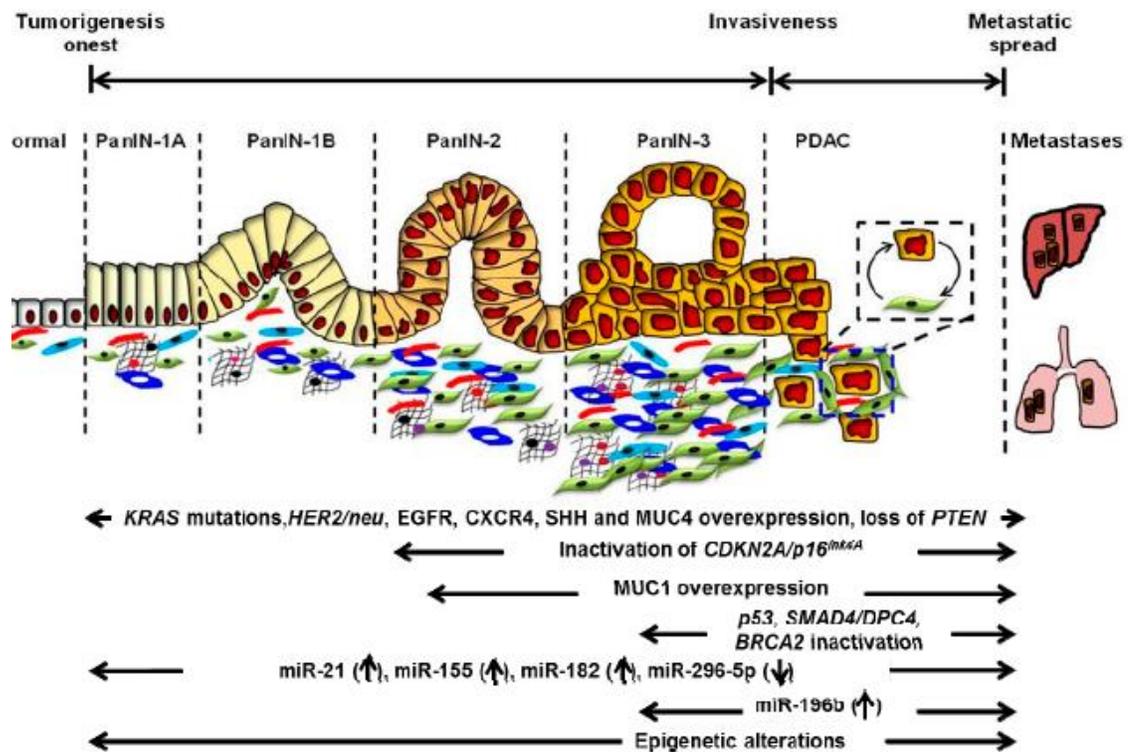


Figura 2 Modelo de la progresión del ADCP y los cambios moleculares asociados al ADCP.

Alteraciones genéticas que se presentan tempranamente al inicio del ADCP como las mutaciones en KRAS, amplificación en HER2, la inactivación de PTEN ocurren desde las lesiones PanIN de bajo grado PanIN I A/ B. La inactivación de CDKN2A ocurre en las lesiones PanIN-2, y finalmente la pérdida de SMAD4 y p53 ocurren en las lesiones PanIN-3. Al mismo tiempo que ocurren las alteraciones genéticas también hay una desregulación de los mecanismos epigenéticos. Modificaciones epigenéticas como la metilación aberrante del ADN y el aumento o disminución en la expresión de ciertos micro ARN es un evento que se ocurre desde las lesiones PanIN de bajo grado (Tomado de Khan *et al.*, 2017).

1.5 Mecanismos moleculares en la patogénesis del ADCP

El modelo de la progresión del ADCP que explica el inicio y progresión del adenocarcinoma ductal pancreático a través de un proceso multipasos a partir de lesiones precursoras no invasivas (PanIN, IPMN, MCN) hasta llegar a un ADCP va acompañado de la acumulación de tanto alteraciones genéticas como epigenéticas las cuales se describirán a continuación. (Figura 2).

1.5.1 Alteraciones genéticas

Los eventos genéticos involucrados en el inicio y progresión del ACDP incluyen mutaciones en genes claves que lleva a la activación de oncogenes y a la inactivación de genes supresores de tumores y consecuentemente a la desregulación de las vías de señalización oncogénicas. Por lo que a continuación mencionaremos solo algunos de los ejemplos más importantes.

1.5.1.1 Activación de oncogenes

Las mutaciones activadoras en el oncogen KRAS2 es la alteración genética que se presenta con mayor frecuencia en el ACDP y está presente en aproximadamente 93% de los casos. Las mutaciones en KRAS ocurren desde las lesiones PanIN de bajo grado (PanIN-1A/B) (figura 2) y se encuentran con una gran frecuencia lo que soporta su papel como un evento iniciador en el desarrollo de cáncer pancreático(Maitra & Hruban, 2008). El gen KRAS codifica para una GTPasa pequeña del mismo nombre que media diversas funciones celulares incluyendo proliferación, supervivencia celular, remodelación del citoesqueleto y motilidad, entre otros. Una variedad de estímulos como la unión de factores de crecimiento a sus respectivos receptores inician una vía de transducción de señales que culmina con la activación de la proteína K-Ras(Maitra & Hruban, 2008). La mutación en el gen K-RAS que se presenta con mayor frecuencia (en el 98% de los casos), en este tipo de cáncer, es una mutación puntual en el codón 12 la cual genera un cambio de GGT a GAT, o de GGT a GTT, o de GGT a CGT lo que resulta en una sustitución de una glicina por un aspartato, valina o arginina respectivamente. Además de que mutaciones en los codones 13 y 69 también llegan a presentarse aunque con una menor frecuencia (Khan et al., 2017). La mutación que genera el cambio de glicina por aspartato estabiliza la configuración de la proteína K-RAS unida a GTP lo que conduce a la activación constitutiva de las vías efectoras de Ras: Raf/MEK/ERK

(MAPK) y PI3K/AKT y culmina en la proliferación celular y la supervivencia (Maitra & Hruban, 2008).

En los pocos casos de ACDP en los que la mutación de K-RAS está ausente (~7%) se han identificado alteraciones genéticas en otros componentes de la vía MAPK cinasas que conducen a la activación de esta vía, un ejemplo es BRAF que se encuentra mutado en un tercio de estos tumores en los que el gen KRAS se conserva normal. También se han observado mutaciones en reguladores negativos de la vía RAS-MAPK como NF1, SPRED1, and DUSP6 (Maitra & Hruban, 2008; Raphael et al., 2017).

C-MYC es otro oncogen que se encuentra sobre-expresado en ACDP debido a una amplificación del gen (incremento en el número de copias de una secuencia génica) la cual es encontrada del 20 al 30% de los casos de ACDP. C-Myc es un factor de transcripción que activa la expresión de genes involucrados en la transformación celular, crecimiento celular, progresión del ciclo celular y metabolismo. La expresión de c-Myc en el contexto del ACDP se ha demostrado es regulada y activada por el factor de transcripción NFAT (factor nuclear de células T activadas) el cual también se encuentra sobre expresado en los tumores pancreáticos desde las lesiones PanIN-2 (Khan et al., 2017).

Otros ejemplos de oncogenes que también se encuentran alterados por amplificación en ACDP es MYB, el cual está amplificado en aproximadamente 10% de los tumores pancreáticos, y ERBB2 que está amplificado en ~ 2% de los casos de ACDP, y que el aumento en la expresión de estos oncogenes es consecuencia de su amplificación. El gen MYB codifica para una proteína que actúa como un activador transcripcional en la mayoría de los casos y también coopera con otros factores de transcripción para inducir sinérgicamente la expresión de genes. En el cáncer pancreático MYB promueve la progresión tumoral a través de la disminución de la expresión de

los genes CDKN1B/p27 y CDKN1A/p21. Estos dos últimos genes codifican para proteínas inhibidoras del ciclo celular, por lo que la ausencia de éstas favorece la división celular de las células tumorales. En contraparte MYB incrementa la expresión del gen BCL que codifica para una proteína anti apoptótica confiriendo de este modo resistencia a la muerte celular a las células tumorales. Aunado a lo anterior MYB favorece el fenotipo maligno de las células tumorales al incrementar sus propiedades de invasión y migración ya que aumenta la expresión de los genes VEGF (Factor de crecimiento del endotelio vascular) y MMP7 (metaloproteasa-7) necesarios para la diseminación del tumor (Khan et al., 2017; Srivastava et al., 2015).

Por su parte ERBB2 que codifica para el receptor 2 del factor de crecimiento epidermal humano (HER2), está involucrado en la regulación de varias funciones celulares incluyendo crecimiento celular, supervivencia y diferenciación. La consecuencia de su sobreexpresión es un aumento en la activación de las vías de señalización río abajo de este receptor lo que culmina con el crecimiento tumoral (Khan et al., 2017).

1.5.1.2 Inactivación de genes supresores de tumores

Por otra parte los principales genes supresores de tumores desregulados en ACDP son CDKN2A/p16 (Inhibidor de cinasas dependiente de ciclinas), TP53 (proteína tumoral p53), y SMAD4/DPC4 los cuales se describirán a continuación.

CDKN2A es el gen supresor de tumores más comúnmente inactivado en ACDP. Las alteraciones genéticas en CDKN2A son adquiridas en las lesiones pre-neoplásicas de grado intermedio PanIN-2 (Figura 2) y han sido observadas en una frecuencia 90% de los casos de pacientes con ACDP. La pérdida de la función de CDKN2A ocurre por diferentes mecanismos incluyendo delección homocigota, en el 40% de los casos, mutación intragénica con pérdida del

segundo alelo (40%) y por silenciamiento epigenético (~ 20%) el cual se abordara más tarde (Raphael et al., 2017).

Pero ¿cómo las alteraciones genéticas en CDKN2A contribuyen a la progresión de las lesiones precursoras a un ACDP? La proteína que codifica este gen, p16, es un inhibidor de las cinasas dependientes de ciclina: CDK4 y CDK6 las cuales median el paso de la fase G1-S durante el ciclo celular. La función normal de estas cinasas consiste en fosforilar a la proteína del retinoblastoma (Rb) la cual normalmente se encuentra unida al factor de transcripción E2F manteniéndolo inactivo, al fosforilarse Rb cambia su conformación y libera a E2F, y permite que éste active la transcripción de genes requeridos para el paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. De tal modo que al no estar presente p16, la proteína Rb resulta continuamente fosforilada por CDK4 y CDK6 lo que conduce a la activación de los genes blanco de E2F (Khan et al., 2017).

La inactivación del gen supresor de tumores TP53 es un evento tardío en la progresión del cáncer pancreático generalmente se observa en lesiones pre neoplásicas de alto grado PanIN-3 (Figura 2) (Khan et al., 2017). La inactivación de este gen está presente en aproximadamente el 50 – 75% de los casos de ACDP y ocurre a través de mutaciones intragénicas combinadas con la pérdida del segundo alelo. La proteína p53, es un factor de transcripción y tiene diferentes funciones en la célula incluyendo la regulación del ciclo celular en la fase G1-S, el mantenimiento del arresto en las fases G1-M y la inducción de la apoptosis. La inactivación de TP53 conduce a la progresión del ciclo celular en el paso de G2-M aún en presencia de daño al ADN evitando que la célula entre en apoptosis e incrementa de esta forma la inestabilidad genómica, lo que permite que se acumulen mutaciones con mayor rapidez (Khan et al., 2017).

Al igual que TP53 la inactivación del gen SMAD4, también conocido como DPC4 (*del inglés deleted in pancreatic carcinoma*) ocurre en las lesiones precursoras avanzadas PanIN-3 (Figura 2). Este gen supresor de tumores es inactivado en aproximadamente 55% de los pacientes con cáncer pancreático, el mecanismo de inactivación ocurre por delección homocigota en el 30% de los casos o por mutación intragénica y pérdida del segundo alelo en el 25% de los casos (Lomberk & Urrutia, 2015).

El gen SMAD4 codifica para un factor de transcripción del mismo nombre, esta proteína se encuentra río abajo del receptor de factor de crecimiento transformante (TGF- β). La vía de TGF- β es activada cuando esta proteína se une a sus receptores transmembrana de tipo II y tipo I (T β RII y T β RI) esto activa una cascada intracelular que resulta en la fosforilación de las proteínas Smad 2 y Smad 3 los cuales se unen a Smad4 formando un complejo trimérico que se transloca al núcleo donde SMAD4 actúa como un regulador transcripcional. SMAD4 inhibe la proliferación celular induciendo arresto del ciclo celular en la fase G1, por tanto la pérdida de SMAD4 en las células cancerosas les confiere una ventaja de crecimiento selectiva. Por tal motivo la pérdida de TP53 y SMAD4 que ocurren en las lesiones PanIN-3 son considerados eventos conductores de la metástasis (Katsuno, Lamouille, & Derynck, 2013).

BCRA2 es otro gen que se encuentra inactivado en ACDP, y al igual que los anteriores ocurre tardíamente en las lesiones PanIN-3. BCRA2 es un gen necesario para la reparación del ADN. Por lo que su inactivación genera inestabilidad genómica incrementando la velocidad con la que se acumulan las mutaciones (Khan et al., 2017).

Otro gen supresor de tumores que se encuentra deletado en ACDP aunque con una menor frecuencia es PTEN. La pérdida de PTEN ocurre temprano en el desarrollo del ACDP en las lesiones pre-neoplásicas tempranas PanIN-1. Este gen codifica para una fosfatasa que regula

negativamente la vía de PI3K-AKT-mTOR la cual promueve el crecimiento celular y la supervivencia, en esta vía la cinasa PI3K fosforila a un lípido de membrana PIP-2 (fosfoinosítide-4,5 bifosfato) generando PIP3 (fosfatidil inositol-3,4,5-trifosfato). Este lípido es capaz de reclutar a la serina treonina cinasa AKT a la membrana plasmática desencadenando una cascada intracelular que conduce a la activación de varios efectores como mTORc1 el cual impacta en el crecimiento celular. PTEN regula negativamente la vía al defosforilar PIP-3 terminando de esta forma la señalización, por tanto la pérdida de PTEN lleva a la activación constitutiva de la cinasa AKT y sus efectores(Khan et al., 2017).

Otros genes involucrados en diferentes procesos celulares relacionados con proliferación y reparación del ADN han sido encontrados alterados en el adenocarcinoma ductal pancreático aunque con menor frecuencia (Ho et al., 2019)(Figura 3). Sin embargo las alteraciones genéticas no representan los únicos mecanismos moleculares que conducen a la tumorigénesis como se discutirá a continuación.

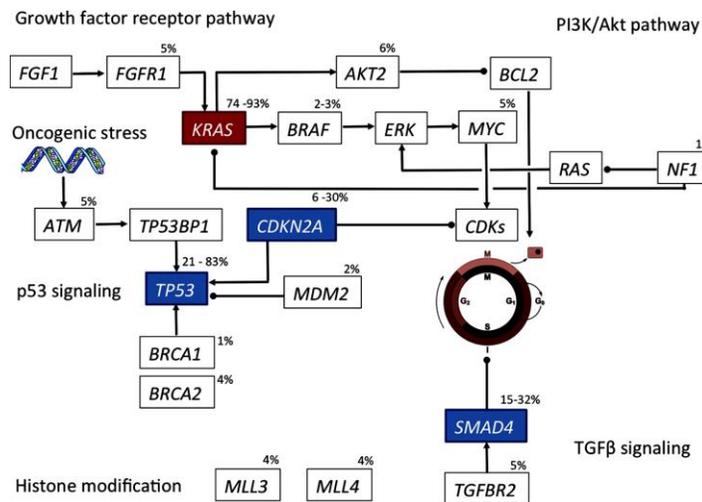


Figura 3 Genes que se encuentran alterados en el ACDP

En rojo *KRAS*, se encuentra ubicuamente mutado en 93% de los pacientes con ACDP. *TP53*, *SAMD4* y *CDKN2A* son genes supresores de tumores que se encuentran inactivados por alteraciones genéticas con una prevalencia que varía. Los porcentajes representan la prevalencia de las mutaciones en muestras de pacientes con ACDP. (Tomado de Ho J, et al. 2018)

1.5.2 Mecanismos epigenéticos involucrados en el desarrollo del ACDP

En la última década se ha logrado obtener la secuencia completa del genoma humano. Este conocimiento ha permitido identificar las alteraciones genéticas involucradas en la transformación de las células normales a células tumorales. Lo que ha ayudado a una mejor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo del ACDP. Sin embargo, estos estudios no han sido suficientes para traducirse en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el ACDP. Además de que las alteraciones genéticas ya descritas, no permiten explicar la expresión diferencial de genes en el ACDP. Por lo que todo esto, ha llevado a extender la investigación al estudio de los mecanismos epigenéticos que regulan la expresión génica en el ACDP.

1.5.2.1 Modificaciones epigenéticas

Actualmente se sabe que el desarrollo del ACDP no se debe exclusivamente a alteraciones genéticas, sino que además existe un *cross-talk* con mecanismos epigenéticos (Iguchi et al., 2016), los cuales en conjunto dan origen a la transformación neoplásica, además de que también determina muchas de las características del fenotipo del cáncer y sus síntomas. Por lo que entonces, tanto alteraciones genéticas como epigenéticas contribuyen al desarrollo y progresión de esta enfermedad. Afortunadamente, con el conocimiento de la epigenética, se ha logrado una mayor comprensión de los mecanismos que favorecen la progresión del ACDP, y se han logrado proponer nuevas herramientas para el diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad.

La epigenética es un tipo de memoria celular y molecular que abarca aquellos mecanismos moleculares encargados de regular el encendido y el apagado de los genes sin que se modifique la secuencia de ADN, los cuales son heredables y reversibles. Se han reportado siete mecanismos de

regulación epigenética entre ellos: 1) La metilación del ADN, 2) las modificaciones post-traduccionales de las histonas, 3) las variantes de histonas, 4) los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP, 5) miembros de la familia Polcomb y Triotorax 6) RNA no codificantes y 7) la proteólisis del extremo amino de las histonas.

Estos mecanismos epigenéticos ocurren tanto a nivel del ADN como a nivel de la cromatina y en conjunto constituyen el código epigenético que modula la expresión del genoma en diferentes tipos celulares a través de etapas de desarrollo y en diversos estados de enfermedad incluyendo el cáncer. A continuación se describirán brevemente cada uno de estos mecanismos epigenéticos y se detallará cómo algunos de ellos participan en la biología del ACDP (Silverman & Shi, 2016).

1.5.2.2 Modificaciones epigenéticas a nivel de ADN: Metilación de ADN

La metilación del ADN corresponde al único mecanismo epigenético que ocurre directamente sobre el DNA. Esta modificación covalente ocurre en regiones extensas del genoma enriquecidas en los dinucleótidos CpG de más de 200 pb, llamadas islas CpG. Aunque la metilación se lleva a cabo casi siempre en las islas CpG otras citosinas localizadas en otras regiones del genoma pueden también ser susceptibles a esta modificación (McCleary-Wheeler et al., 2013). La metilación del ADN es realizada por las enzimas ADN metil transferasas (DNMTs) las cuales transfirieren un grupo metilo de la S-adenosilmetionina (SAM) al carbono de la posición 5 de la citosinas para formar la 5-metilcitosina (5mC). Existen tres DNMTs activas en mamíferos encargadas de realizar la metilación esta son: la DNMT1, la cual se encarga de mantener los patrones de metilación durante la división celular y las DNMT3a y DNMT3b, las cuáles efectúan la metilación *de novo*. DNMT3L es una proteína regulatoria que no tiene actividad de metil transferasa pero estabiliza a DNMT3a y DNMT3b para incrementar la metilación *de novo*. Por lo tanto la metilación del ADN

puede ser heredada a través de generaciones a las células hijas o puede ser adicionada *de novo* (Silverman & Shi, 2016).

La manera en que la metilación regula la expresión de genes es a través de los grupos metilo adicionados en las islas CpG ubicadas en las secuencias promotoras de los genes. De tal manera que la adición de estos grupos metilos, impiden la unión de los factores de transcripción además de atraer proteínas con dominios de unión a CpG metiladas (MBD) para iniciar la compactación de la cromatina. Por lo que la metilación del ADN se asocia casi siempre con el silenciamiento en la expresión de los genes o represión transcripcional. Mientras que, la metilación en el cuerpo del gen, puede facilitar la elongación de la transcripción y también se correlaciona con una transcripción activa y *splicing* (Iguchi et al., 2016; Silverman & Shi, 2016).

La metilación del ADN es una modificación reversible, la eliminación de los grupos metilo es llevada a cabo por las enzimas TET (*del inglés Ten eleven traslocation*), estas enzimas a través de una serie de pasos de oxidación sucesivas en presencia de agua, oxígeno y α -cetoglutarato primero oxidan la 5-mC, en 5-hidroximetilcitosina (5hmC), luego a 5-formilcitosina (5-fC) y por último a 5-carboxilcitosina (5-caC). Después tanto 5-fC como 5-caC pueden ser reemplazadas por un citosina no modificada a través de un mecanismo de reparación por escisión de base mediada por glicosilasa de ADN timina (Jin et al., 2018). Así, mientras que la metilación impide la unión de los factores de transcripción, la demetilación permite el acceso a la región promotora de los factores de transcripción promoviendo la transcripción de dichos genes (Silverman & Shi, 2016).

¿En general cómo explica esta modificación epigenética el inicio y progresión del cáncer? Este mecanismo epigenético favorece el proceso oncogénico a través de la metilación aberrante de los promotores de los genes supresores de tumores (hipermetilación), evitando su expresión y por otro lado la eliminación de las marcas de metilación de las regiones promotoras de los oncogenes (hipometilación), conduce a su activación, de hecho el silenciamiento transcripcional

mediado por metilación de las secuencias promotoras del ADN es la alteración epigenética más reconocida y estudiada en cáncer(Khan et al., 2017).

La metilación del ADN ha sido el mecanismo epigenético más ampliamente estudiado en el ACDP y ha sido reportado tanto en lesiones precursoras como en ACDP indicando que alteraciones en el proceso de metilación del ADN, juegan un papel importante en la iniciación y progresión del ACDP.

En el ACDP algunos promotores de genes supresores de tumores se han encontrado metilados en las lesiones pre-neoplásicas (PanIN). Un ejemplo muy estudiado es el gen CDKN2A/p16, del cual ya se ha descrito que se encuentra inactivado en el 90% de los casos de ACDP y que aproximadamente en el 20% de los casos la inactivación del gen es mediada por hipermetilación de su promotor. El resultado de la adición de los grupo metilos es que ya no pueden unirse al promotor de este gen factores de transcripción que permiten su expresión como SP-1 y en su lugar se reclutan otras proteínas como las MBDs que pueden a su vez unir proteínas efectoras como las HDACs lo cual conduce a la represión transcripcional de este gen (Iguchi et al., 2016; McCleary-Wheeler et al., 2013).

Otro ejemplo en donde la metilación del ADN contribuye en el desarrollo del ACDP es el gen FOXA1/2, el cual está asociado con la inhibición de la transición epitelio-mesénquima (EMT), al regular positivamente la transcripción de E-cadherina. Este gen en el caso del ACDP, se encuentra silenciado por hipermetilación del promotor, lo cual favorece el fenotipo invasivo de la enfermedad (Wang et al., 2014).

Sin embargo, los mecanismos por los cuales la metilación de genes que normalmente no deberían estar metilados y la pérdida del patrón de metilación están alterados no son completamente entendidos. Aunque varios estudios han demostrado que en ACDP existe una sobre-expresión de la DNMT1, DNMT3a y DNMT3b. En el caso de la DNMT1 se ha encontrado

que su sobre-expresión ocurre a través de la proteína nuclear 1 (Nurp1) y que la sobre-expresión de DNMT1 coopera con la mutación del gen KRAS^{G12D} para el desarrollo de las lesiones pre-neoplásicas PanIN (Iguchi et al., 2016).

Paralelo a los eventos de metilación, otros genes normalmente silenciados en las células pancreáticas experimentan la eliminación del patrón de metilación de su promotor (hipometilación). Lo cual conduce a la expresión de genes que en condiciones normales no deberían ser expresados. Un ejemplo de esto se observa en el gen que codifica para el factor intercambiador de nucleótidos de guanina específico de células hematopoyéticas, VAV1, el cual promueve la actividad de KRAS llevando a la proliferación celular en ACDP (McCleary-Wheeler et al., 2013).

Otro ejemplo de gen con pérdida de las marcas de metilación en su promotor es el gen de la mucina 4 (MUC4), el cual se encuentra sobre-expresado en las lesiones precursoras PanIN-I. También los promotores de algunos oncogenes como JUNB, MYB y FOS se encuentran hipometilados y sobre-expresados en ACDP. Pero esta hipometilación no sólo atañe a factores de transcripción sino también se ha observado en algunas proteínas modificadores de histonas como la metiltransferasa de histona SETD8, la cual es responsable de metilar a la histona H4 en la lisina K20, y la histona demetilasa de lisina KDM6A. Las cuales como consecuencia de la hipometilación de su promotor también se encuentra sobre expresadas en ACDP (Iguchi *et al.*, 2016). Adicionalmente la pérdida de la metilación de elementos repetitivos como los transposones puede incrementar inestabilidad genómica, conduciendo a deleciones cromosomales, translocaciones y amplificaciones que son típicas de muchos cánceres (Iguchi et al., 2016).

Estos ejemplos de metilación aberrante de genes en el ACDP son importantes para entender cómo además de las alteraciones genéticas otros mecanismos contribuyen a la

inactivación de genes supresores de tumores importantes y a la activación de oncogenes que finalmente van a contribuir al inicio y progresión de la enfermedad. A continuación veremos como la alteración en el patrón de las marcas en las histonas también contribuye a la tumorigénesis.

1.5.2.3 Modificaciones epigenéticas a nivel de la cromatina: Modificaciones post traduccionales de histonas (PTMs)

En lo que respecta a los mecanismos epigenéticos que ocurren a nivel de la cromatina se encuentran las modificaciones post-traduccionales de las histonas, variantes de histonas, complejos remodeladores dependientes de ATP, RNAs no codificantes, proteólisis del extremo amino de la histona H3 y arquitectura nuclear.

Pero ¿cómo ocurre esto? Primero debemos recordar que el ADN se encuentra empaquetado en el núcleo de las células eucariotas con histonas, proteínas reguladoras no histónicas y ARN no codificantes largos y pequeños en forma de un complejo llamado cromatina cuya unidad funcional es el nucleosoma. Cada nucleosoma está compuesto de un octámero de histonas, dos de cada una de las histonas canónicas: H2A, H2B, H3 y H4, alrededor del cual se enrollan aproximadamente 146 pares de bases. Otro tipo de histona, la H1 se une a las regiones de ADN que conectan los nucleosomas adyacentes en la fibra de cromatina facilitando aún más la compactación del ADN (Lomberk & Urrutia, 2015).

Las histonas representan el principal componente proteico de la cromatina y gran parte de su síntesis está ligada con la replicación del ADN, es decir ocurre durante la fase S del ciclo celular permitiendo un adecuado empaquetamiento del ADN recién replicado (Dryhurst et al., 2009). Su extremo N-terminal, también llamado colas de las histonas, sobresale de los nucleosomas quedando accesible a proteínas y complejos proteicos capaces de unir covalentemente grupos

químicos modificando post-traduccionalmente (PTM) a las histonas. Aunque actualmente se ha corroborado que las PTMs no son exclusivas del extremo amino sino que también ocurren en el extremo carboxilo de estas proteínas que aunque están menos expuestas también son susceptibles de sufrir PTMs que son importantes en la movilidad y estabilidad de las histonas (Lomberk & Urrutia, 2015). Se conocen distintos tipos de PTMs que ocurren en las histonas tales como: la acetilación, metilación, ubiquitilación, fosforilación, sumoilación, deaminación. Todas ellas referidas como “marcas de histonas” o “marcas epigenéticas” (Iguchi et al., 2016), que regulan la transcripción, replicación y reparación de genes.

Pero ¿cuál es la relevancia biológica de estas PTMs? Éstas constituyen la base de lo que se ha nombrado “hipótesis del código de histonas” la cual se ha propuesto para explicar la correlación entre la presencia de las marcas de histonas en distintas regiones del ADN: como promotores, *enhancers*, cuerpo del gen y otros elementos regulatorios con un resultado biológico particular. Ya que las PTMs de manera individual o en combinación ocasiona el reclutamiento de efectores modificadores de la cromatina determinando así si un gen debe ser transcrito o silenciado (Iguchi et al., 2016).

¿Qué proteínas están involucradas en realizar las PTM? Dentro del modelo del código de histonas se han establecido los conceptos de “escritores” para aquellas enzimas modificadoras de histonas que colocan las marcas en estas proteínas, de “lectores” para las proteínas efectoras que reconocen y se unen a las marcas teniendo un impacto en la estructura de la cromatina y “borradores” para las enzimas que eliminan las marcas (Iguchi E., *et al.* 2016). Entre las enzimas “escritoras” las más estudiadas son las histona metiltransferasas (HMT), siendo las enzimas metiltransferasas de lisina (HKMT) las más caracterizadas. Entre las proteínas que introducen los grupos

acetilos en las lisinas están las histonas acetil transferasas (HAT). Algunos ejemplos representativos de éstas son: la proteína de unión a CREB (CBP), p300 y el factor asociado a p300/CBP (P/CAF), las cuales adicionan grupos acetilo, y las ubiquitin ligasas que adicionan ubiquitina (Silverman et al, 2016). Debido a que la modificación de las histonas es un proceso dinámico, las reacciones catalizadas por estas enzimas son revertidas por otras enzimas que eliminan los grupos químicos y se conocen como “borradores”. Entre los borradores se incluyen a las demetilasas de histonas (HDMs), las cuales eliminan los grupos metilo de las histonas, las histonas deacetilasas (HDAC), las cuales eliminan los grupos acetilo de las histonas y las deubiquitinasas (Lomberk & Urrutia, 2015).

De todas las marcas epigenéticas que ocurren en las histonas las más estudiadas son las modificaciones realizadas en el extremo amino de la histona H3 y en particular en los residuos de lisina, como la metilación y la acetilación. Dependiendo del residuo de lisina que sea modificado el resultado podría ser el silenciamiento o activación transcripcional. Adicionalmente, en el caso de la metilación, cada residuo puede ser mono, di o tri metilado volviendo más compleja la regulación (Silverman & Shi, 2016). Esto nos lleva a la siguiente pregunta ¿cómo es que estas marcas epigenéticas pueden causar la activación o represión transcripcional? En el caso de la acetilación en las lisinas de las histonas, la adición de grupos acetilos neutraliza la carga positiva de las histonas, ocasionando el debilitamiento de la interacción entre el ADN cargado negativamente y las histonas (cargadas positivamente), generando una estructura de cromatina más abierta permitiendo así la transcripción de los genes. De manera general se ha establecido que las marcas de acetilación en los residuos de lisina, 9 , 13, 18 , 23 y 27 de la histona H3 que conforman a los nucleosomas ubicados en la región promotora de un gen específico permiten su activación transcripcional (Iguchi et al., 2016).

A diferencia de la acetilación, la metilación de las histonas no produce alteraciones en la carga de las histonas, esta es la razón por la que la metilación de histonas puede ser tanto una marca activadora como represora dependiendo del residuo y grado de metilación. La metilación puede ser realizada tanto en lisinas como argininas. Algunas marcas específicas de metilación en las lisinas de histonas localizadas en las regiones promotoras asociadas con activación transcripcional son: H3K4me3 y H3K36me3 mientras que la H3K9me3 y H3K27me3 están asociadas con represión transcripcional ya que favorecen la formación de un cromatina compacta que no se transcribe (Iguchi et al., 2016).

En el caso de la metilación de las argininas la adición de los grupos metilos es realizada por las enzimas metil-transferasas de argininas (PRMT). Las cuales pueden mono o dimetilar a las argininas de manera simétrica o asimétrica (en el caso de la di-metilación). La metilación de las argininas ocurre en los residuos R2, R17 y R26 de la histona H3 y es realizada por la PRMT4/CARM1. En lo que respecta a la histona H4, ésta también puede ser metilada en la arginina R3 tanto por PRMT1 y PRMT5, con diferentes resultados. Ya que si la metilación la realiza la PRMT1 quién es capaz de mono o dimetilar a la R3 de manera asimétrica permitirá la activación transcripcional. Sin embargo, si la adición del grupo metilo es realizada por PRMT5 (la cual dimetila de manera simétrica a la R3 de la histona H4), adquirirá una marca epigenética asociada al silenciamiento del gen (Bedford & Clarke, 2009).

1.5.2.4 Modificaciones post-traduccionales en el ACDP

Actualmente, la acetilación y la metilación de las histonas representan los únicos mecanismos basados en PTMs de las histonas, que se sabe, tienen efectos sobre el proceso carcinogénico del páncreas. A nivel global, se ha reportado la disminución de la H3K27me3, la cual se asocia al grado del tumor y a la propagación a ganglios linfáticos adyacentes (Wei et al., 2008);

mientras que la disminución de la H3K4me2 y de la H3K9me2 se asocian con pobre supervivencia (Manuyakorn et al., 2010). En el caso de la H3K4me3, la disminución de esta PTM indica una pobre diferenciación en el tumor (Watanabe et al., 2012). También un aumento en la acetilación de la lisina 18 de la histona H3 (H3K18ac), en la lisina 9 de la histona H3 (H3K9ac), y de la lisina 12 de la histona H4 (H4K12ac), se asocian con una pobre supervivencia de los pacientes (Juliano et al., 2016)

Por otro lado, gracias a las técnicas de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), y de qRT-PCR, se ha logrado identificar cambios en el enriquecimiento de ciertas PTMs en regiones regulatorias de algunos genes, y se ha podido demostrar cómo estos cambios modifican el estado transcripcional de los mismos. Por ejemplo, se ha reportado un aumento en la H3K9Me2/3 en el extremo amino de las histonas presentes en el sitio de inicio de la transcripción (TSS), del gen MUC1 lo cual conduce a su represión. Mientras que en el gen MUC2, se ha demostrado que existe un enriquecimiento de las marcas H3K4Me2/3, H3K9ac y acetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27Ac), en células de cáncer de páncreas, las cuales permiten la expresión de MUC2.

Pero no solo la adición de grupos acetilo y metilo a los extremos amino terminales de las histonas parecen estar involucrados en el desarrollo del cáncer pancreático, sino también las enzimas responsables de eliminar las marcas de acetilación, es decir, las HDAC. Por ejemplo, se conoce que la HDAC7 se encuentra significativamente elevada en ACPD, además de que su expresión permite discriminar entre ACPD y otros tumores pancreáticos (Ouaïssi et al., 2008). Adicionalmente, se ha observado una cooperación entre el factor de transcripción ZEB1, responsable del silenciamiento de E-cadherina, y las HDACs, ya que la hipermetilación del gen CDH1 (E-cadherina), se debe a la unión del complejo ZEB1-HDACs sobre promotor de E-cadherina. La participación de ZEB1 en reclutar a HDACs para reprimir la expresión de E-cadherina fue corroborada en ratones *knock-down* para ZEB1. En estos ratones se observó que la ausencia de

ZEB1 conlleva a la acetilación de las histonas del promotor de E-cadherina permitiendo así su expresión (Schneider, Krämer, & Saur, n.d.).

En el caso del ACDP también se ha observado que existe tanto una expresión como actividad alterada de varias de las enzimas “escritoras” que modifican a las histonas. Un ejemplo de éstas es la proteína p300, la cual es una histona acetiltransferasa que está altamente activa en ACDP, dicha actividad este influenciada por factores de transcripción específicos como NFAT (Factor nuclear de células T activadas). Tanto en condiciones normales como en cáncer, la vía de calcineurina/NFAT activa la transcripción del oncogen c-Myc. El factor de transcripción NFAT se une al promotor de este oncogen y recluta a p300 a la región promotora de c-Myc. Por su parte p300 induce hiperacetilación y crea una estructura de cromatina permisiva para el reclutamiento de Elk1 una proteína requerida para una máxima activación del promotor de c-Myc lo que finalmente conduce a la expresión de este gen. Esto es particularmente importante en ACDP ya que NFATc1 es inducido en las lesiones precursoras PanIN-2 y está altamente expresado en la mayoría de los ACDP avanzados. Además se ha demostrado que en células de ACDP el factor de transcripción NFAT promueve el crecimiento *in vitro* e *in vivo* a través de la inducción transcripcional de c-Myc (McCleary-Wheeler et al., 2013; Singh et al., 2010).

La metilación como ya se mencionó es también un importante componente del código de histonas, una de las enzimas que realiza esta PTM es la subunidad catalítica EZH2 del complejo represivo Polycomb (PRC2) la cual se encuentra sobre expresada en ACDP. De manera normal el complejo PRC2 realiza la metilación de la histona H3 en la lisina K27 localizada en las regiones promotoras, subsecuentemente la marca depositada en la histona H3K27 por PRC2 recluta al complejo PRC1 completando el silenciamiento transcripcional. La sobre expresión de EZH2 en ACDP conduce al silenciamiento de genes supresores de tumores como la E-cadherina, CDK1C,

BRCA1 y CDKN2A. Por lo que éste último gen no solo es regulado por metilación del ADN en su región promotora sino también por la metilación de las histonas H3 de los nucleosomas que están presentes en la región promotora del gen (Iguchi et al., 2016; McCleary-Wheeler et al., 2013).

1.5.2.5 ARN no codificantes

Un mecanismo epigenético que ha sido muy estudiado en los últimos años corresponde a los ARNs no codificantes (ARNncs). Por análisis de secuenciación masiva de ARN (RNA-seq), se sabe que más del 85% del genoma es transcrito, pero que, solo el 3% de estos transcritos codifican para proteínas (Hangauer, Vaughn, & McManus, 2013), sugiriendo que el resto de los ARNs (82%) puede tener funciones regulatorias. De acuerdo al tamaño que presentan los transcritos no codificantes estos se pueden clasificar en ARNncs largos (ARNLncs), mayores a 200 nucleótidos (nt), y ARNs pequeños (ARNsnc), menores a 200 nt. Específicamente los microARNs (miARNs), que son un tipo de ARN no codificante pequeño, son secuencias que alteran la estabilidad del mRNA. Por su parte, los ARNlncs pueden unirse a factores de transcripción y reclutar complejos modificadores y remodeladores de la cromatina alterando de esta forma la expresión de genes (Holoch & Moazed, 2015).

1.5.2.6 miRNAs y ACDP

De todos los ARNnc pequeños, los miARN son los más comunes, el número de especies de miARN transcritas en el genoma humano son aproximadamente 2000 y cada miARN puede tener múltiples blancos. Se estima que los miARN controlan la actividad de aproximadamente el 30% de todos genes que codifican para proteínas en mamíferos (Iguchi et al., 2016). Los miARN son moléculas de una sola cadena de ARN con un tamaño de 20 a 25 nucleótidos, que están involucrados en el control post-transcripcional de la expresión génica en organismos eucariontes (Iguchi et al., 2016).

Los miRNAs son transcritos por la ARN polimerasa II, se transcriben inicialmente como transcritos primarios o pri-miRNA con una “cap” en su extremo 5' y una cola de poli-adeninas (poly-A) en su extremo 3'. Los pri-miRNA se procesan en el núcleo en estructuras cortas de 70-nucleótidos en forma de tallo-asa (*stem-loop*) conocidas como pre-miRNA por las enzimas DROSHA y PASHA para formar los pre-miARNs. Después son transportados al citoplasma donde se asocian con un complejo multiproteico que contiene las proteínas DICER y ARGONAUTA llamado complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). En este punto el *loop* de la estructura *stem-loop* es cortado por la enzima DICER generando un miARN maduro que guía al complejo RISC a la secuencia complementaria al extremo 3' de su ARN mensajero blanco. Una vez unidos los miARN a su mRNA blanco ejercen una regulación negativa sobre la expresión génica por diferentes mecanismos: 1) deanonilación del mRNA por reclutamiento de un complejo deadenilasa que desestabiliza el mRNA y lo conduce a su degradación; 2) Inhibición de la iniciación de la traducción y 3) Inhibición de la elongación de la traducción (Iguchi et al., 2016; McCleary-Wheeler et al., 2013).

En los últimos años se ha estudiado el papel de los microARNs en la biología del cáncer, principalmente en la capacidad que tienen para facilitar el crecimiento tumoral, invasión, angiogénesis y evasión de la respuesta inmune. Además a nivel clínico el perfil de ciertos miARN puede definir el subtipo de cáncer, estadio, supervivencia y algunos otros sirven como pronóstico o para monitorear la respuesta al tratamiento.

En el ACDP se han detectado alteraciones en la expresión de una gran cantidad de miARNs lo cual se debe principalmente a la alteración en la metilación de sus regiones promotoras. Hasta la fecha se ha reportado la alteración en la expresión de aproximadamente 422 miARNs en ACDP (pancreaticcancerdatabase.org/2015). De éstos solo algunos miARNs han sido descritos que participan en etapas tempranas del ACDP. Por ejemplo el miR-138A se encuentra silenciado por

hipermetilación en su promotor en lesiones pre-neoplásicas PanI y PanII. Por otro lado miembros de la familia miR-200 se encuentran disminuidos en ACDP invasivo. La baja expresión de los miR-200s favorece el fenotipo metastásico e invasivo, ya que la función normal de estos miARN es regular negativamente la expresión de ZEB1 y ZEB2. Éstas son proteínas que funcionan como represores transcripcionales de la E-cadherina, una proteína que forma parte de las uniones adherentes de célula-célula y por tanto modula negativamente la transición epitelio mesénquima (EMT). Por lo que al no estar expresados los microARN de la familia miR-200 hay mayores niveles de ZEB1 y ZEB2 los cuales inhiben la expresión de la E-cadherina lo que conduce finalmente a la EMT (McCleary-Wheeler et al., 2013). Otro ejemplo de microARN cuya expresión se encuentra disminuida en ACDP es el miR-34, uno de sus blancos es el gen antiapoptótico Bcl-2, en condiciones normales la expresión de este miARN es dependiente de p53, esto es particularmente relevante en tumores en los que se ha perdido la función de p53 y en consecuencia la expresión de miR-34 se ve disminuida. Sin embargo, la expresión de miR-34 se ha encontrado que es inactivada por metilación en las islas CpG de su promotor independientemente del estado de p53. Esto es interesante ya que es un ejemplo de cómo un mecanismo epigenético regula la función de otro (McCleary-Wheeler et al., 2013). Un ejemplo de microARN cuya expresión se encuentra aumentada en ACDP es el miR-155. El blanco de este miARN es el mRNA de TP53INP1, el cual es una proteína pro-apoptótica. En condiciones normales la inducción del gen TP53INP1 también es dependiente de p53. En ACDP la sobre-expresión del miR-155 conduce a una disminución de TP53INP1 creando un efecto aditivo en la resistencia a la muerte celular en los tumores en los que p53 se encuentra mutado. El aumento en la expresión del microARN-155 se ha detectado comienza a partir de las lesiones pre-neoplásicas PanIN-3 (McCleary-Wheeler et al., 2013).

También existe asociación entre algunos microARN y la resistencia a la quimioterapia. Por ejemplo miR-21 se encuentra sobreexpresado en ACDP lo cual es considerado un marcador de mal

pronóstico, este miARN aparece en células cancerosas después del tratamiento de quimioterapia con gemcitabina.

Sin embargo los miARN no son los únicos ARNnc que participan en regular la expresión de los genes ya que hace más de una década se empezó a demostrar que los ARNnc tienen un papel predominante en regular la expresión génica por lo que se describirán a continuación.

1.5.2.7 ARN largos no codificantes

Ya se ha mencionado que los ARNnc tienen un tamaño mayor a 200 bases, y que al igual que los mRNA son transcritos por la ARN polimerasa II, tienen frecuentemente en su extremo 5' una estructura "cap", sufren de *splicing* y poliadenilación en su extremo 3' (Quinn et al, 2016). Los ARNnc son clasificados de acuerdo a la región del gen en el que transcriben como: 1) intrónicos, cuando se originan dentro de los intrones de un gen codificante de proteínas, 2) cis-antisentido cuando son transcritos a partir de la cadena opuesta a su ARNm, o 3) intergénicos, cuando son transcritos entre genes que codifican para proteínas (Marchese, Raimondi, & Huarte, 2017).

Los ARNnc están involucrados en diversos procesos ya que: 1) Pueden funcionar como señales moleculares que integran la información celular espacio-temporal, de desarrollo y específica de estímulo para la activación transcripcional de genes específicos. 2) También funcionan como un señuelo, ya que tienen la habilidad de secuestrar a distintas proteínas: factores de transcripción, proteínas de *splicing*, modificadores de la cromatina formando complejos ribonucleoproteicos y evitando su acceso al ADN, y finalmente 3) funcionan como guías para una adecuada localización de los complejo modificadores de cromatina así como de otras proteínas nucleares a *loci* genómicos particulares para ejercer sus efectos ya sea la activación o represión de genes específicos (Marchese et al., 2017).

1.5.2.8 ARN largos no codificantes y ACDP

También se ha encontrado que los ARN largos no codificantes están expresados diferencialmente en el ACDP indicando su participación en la biología de este tipo de cáncer. Un ejemplo de ARNlnc que está diferencialmente expresado en ACDP es el ARNlnc H19 cuya expresión está incrementada en tumores pancreáticos. Normalmente H19 es altamente expresado en etapas tempranas en la embriogénesis y vida fetal en muchos órganos. Sin embargo después del nacimiento prácticamente no se expresa. Pero ¿cómo participa H19 en la progresión tumoral? Se cree que H19 funciona como una esponja molecular del micro ARN let-7, es decir H19 se une por complementariedad a let-7 impidiendo que let-7 se una a su mRNA blanco el cual es el ARNm de la proteína HMGA2 (proteína del grupo de alta movilidad A2). Por su parte HMGA2 actúa como factor de transcripción y media la EMT. El mecanismo por el cual HMGA2 media este fenómeno es a través de la cooperación con los factores de transcripción SMAD para unirse al promotor de SNAIL1 promoviendo su transcripción. Por su parte SNAIL1 también es un factor de transcripción que reprime la expresión de la E-cadherina. Por lo tanto al estar sobre expresado H19 no habrá suficiente micro ARN let-7 que regule negativamente la expresión de HMGA2, por lo que se promoverá la transición epitelio mesénquima favoreciendo así la invasión y metástasis (Kallen et al., 2013).

Como ya se mencionó previamente los ARN largos no codificantes actúan por diferentes mecanismos moleculares, por ejemplo pueden actuar como guías de complejos remodeladores de cromatina y regular la expresión de los genes. MALAT-1 es un ARNlnc que precisamente actúa de este modo, ya que MALAT-1 interacciona con EZH2, la subunidad del complejo Policomb 2 (PRC2) con actividad de histona metil-transferasa, este complejo MALAT-1-EZH2 es llevado al promotor del gen de la E-cadherina donde EZH2 mono, di y trimetila a la lisina K27 de la histona H3 ubicadas en esta región del gen lo que reprime la expresión de este gen y promueve la metástasis (Iguchi et al., 2016).

Los procesos de replicación, reparación del ADN, transcripción de genes y exporte de los mARN son también regulados por la manera en que están organizadas las secuencias genómicas en el núcleo y la compartimentalización de la maquinaria molecular involucrada en esos procesos, en conjunto a esta organización del genoma en el núcleo se le ha nombrado arquitectura nuclear la cual se describirá a continuación.

1.5.2.9 Arquitectura nuclear

El núcleo está organizado en compartimientos específicos que incluyen cuerpos nucleares, dominios de heterocromatina, territorios cromosomales, complejos multiproteicos compartimentalizados y poros nucleares que permiten el transporte núcleo-citoplasma. La organización espacial, temporal y dinámica del núcleo de las células eucariotas es un determinante más que regula o controla la activación o represión de los genes. Por lo que alteraciones en la arquitectura nuclear como cambios en la matriz nuclear, plegamiento de la cromatina de alto orden, disposición los cromosomas en el núcleo pueden conducir a un estado patológico al desregular los procesos de replicación y reparación del ADN o transcripción (Lomberk & Urrutia, 2015).

Una de las características más comunes de las células cancerosas es la alteración morfológica visible de los núcleos detectables mediante microscopía óptica con la tinción de rutina, y de hecho, los patólogos suelen utilizarla para clasificar y especificar el tipo de cáncer y la etapa, así como la transición de una lesión pre neoplásica PanIN 1B a PanIN 2. Por lo que estudios de la morfometría nuclear puede servir como un indicador pronóstico en el cáncer de páncreas no resecable, así como proporcionar información preoperatoria importante para evaluar la resecabilidad del páncreas. Otro informe demostró que hay una deformación significativa en el territorio del cromosoma 8 en una pequeña cohorte de muestras de pacientes con ACDP en comparación con el epitelio ductal histológicamente normal. Sin embargo, la evaluación detallada

de alteraciones comunes en la arquitectura nuclear en ACDP junto con los enlaces mecanicistas y su impacto específico sobre las funciones nucleares aún está en su infancia (Lomberk & Urrutia, 2015)(Lomerk et al, 2015).

1.5.2.10 Variantes de Histonas

El último mecanismo epigenético que tiene lugar en un contexto cromatínico, corresponde a las variantes de histonas. Por lo que entonces la regulación epigenética se vuelve más compleja debido a la existencia de las variantes de histona. Las variantes de histona presentan diferencias en su secuencia de aminoácidos y a nivel estructural con respecto a las histonas canónicas, debido a estas diferencias las variantes de histona son sujetas a distintas modificaciones post-traduccionales y a la vez reclutan factores específicos incrementando aún más la complejidad funcional de la cromatina(Solomon, Augustine, & Yoon, 2010). Las variantes de histona representan una pequeña porción del *pool* total de histonas que existen en la célula, tienen patrones de expresión temporal y tejido específico y su incorporación en los nucleosomas requiere de factores adicionales llamados chaperonas que pueden interactuar con complejos remodeladores de la cromatina (Vardabasso C., *et al.*, 2016).

¿Qué diferencias existen entre las histonas canónicas y sus variantes? Estas fascinantes proteínas difieren de las canónicas en varias características proteómicas y genómicas. A nivel genómico los genes de las variantes de histona son no alélicos, es decir solamente poseen una copia de ese gen, frecuentemente contienen intrones y los transcritos comúnmente están poli adenilados. Respecto a su expresión y síntesis ocurre a lo largo del ciclo celular de una forma independiente a la replicación, en contraste a las canónicas cuya síntesis es dependiente de la replicación. A nivel de proteína las histonas canónicas y sus respectivas variantes pueden tener diferencias en la secuencia de sus aminoácidos desde uno pocos hasta la adición de dominios completos,

permitiendo así cambios en la estructura del nucleosoma, estabilidad y como ya se mencionó la adquisición de diferentes modificaciones post traduccionales (Zink & Hake, 2016).

Las histonas canónicas H2A, H3 y H1 contienen las variantes de histona más representativas, en contraparte la histona canónica H4 carece de variantes de histonas en organismos eucariontes (Vardabasso et al., 2014) todas las histonas canónicas la histona H2A tiene la mayor cantidad de variantes (19 en humanos), la mayoría de éstas mantiene una considerable homología con la histona canónica H2A a excepción de algunas variantes atípicas: H2A.Z, H2A.X, macroH2A (mH2A), H2A.B y H2A.J de las cuales en este proyecto se describirán solo las de mayor relevancia biológica (Vardabasso et al., 2014).

1.5.2.11 MacroH2A

La histona mH2A estructuralmente es la más distinta de las variantes de histona de la familia H2A debido a la presencia de un macro dominio globular de aproximadamente 30kDa en su extremo carboxilo terminal lo que hace que esta histona presente un tamaño aproximadamente 3 veces mayor al de la histona H2A (Vardabasso et al., 2014). MacroH2A se encuentra asociada normalmente con cromatina condensada por lo que la principal función que se le reconoce a mH2A es como un represor transcripcional, mH2A se encuentra enriquecida en el cromosoma X inactivado transcripcionalmente, en “foci” heterocromáticos asociados a senescencia (SAHF), y en grandes dominios silenciados transcripcionalmente (Vardabasso et al., 2014).

1.5.2.12 H2A.Z

La variante de histona H2A.Z fue descrita por primera vez en los 80s, se encuentra altamente conservada a través de la evolución, y presenta un 60% de identidad en su secuencia de aminoácidos respecto a la histona canónica H2A. H2A.Z representa aproximadamente el 15%

del total de la histona H2A y ha sido de particular interés debido a que se encuentra enriquecida en fracciones de cromatina transcripcionalmente activas (Vardabasso et al., 2014; Weber & Henikoff, 2014). La variante de histona H2A.Z presenta dos isoformas: H2A.Z-1 y H2A.Z-2, que son productos de dos genes no alélicos denominados *H2AFZ* y *H2AFV*, en donde este último gen puede generar por *splicing* alternativo una tercera isoforma denominada H2A.Z.2.2 (Vardabasso et al., 2014).

Las isoformas H2AZ.1 y H2AZ.2.1 difieren en solamente tres aminoácidos indicados por dos puntos (posición 15, 39 y 128). Por su parte la isoforma H2AZ.2.2 en su extremo amino terminal presenta sus mayores diferencias ya que tiene una delección de 13 aminoácidos resultados del *splicing* alternativo además de que tiene seis aminoácidos diferentes a las otras 2 isoformas (Vardabasso et al., 2014; Weber & Henikoff, 2014)(Figura 4 A). A pesar del alto porcentaje de similitud entre las tres isoformas de H2A.Z, aun no son claras las funciones que realiza cada isoforma debido a que no hay un anticuerpo específico para cada una de las isoformas.

1.6 Funciones de H2A.Z

H2A.Z es expresada constitutivamente a través del ciclo celular y es incorporada a la cromatina de manera independiente de la replicación, una vez incorporada H2A.Z influencia diferentes procesos celulares como: regulación transcripcional, memoria epigenética, establece los límites de la heterocromatina, estabilidad del genoma, segregación de los cromosomas e integridad de los telómeros (Giaimo, Ferrante, Herchenröther, Hake, & Borggrefe, 2019). Sin embargo, la función mejor caracterizada de H2A.Z es en el control transcripcional (Vardabasso et al., 2014). Esta variante se encuentra enriquecida en los promotores de los genes y otras regiones regulatorias como “insulators” y “enhancers”, y aunque H2A.Z generalmente tiene un efecto

positivo en la expresión de genes también se han identificado genes a los que regula negativamente (Vardabasso et al., 2014). ¿Cómo H2A.Z es capaz de participar en esta gran variedad de eventos celulares?, esto se debe en gran parte a las modificaciones post-traduccionales a las que son sujetas ambas isoformas (Vardabasso et al., 2014). Entre las PTMs que sufre la histona H2A.Z incluyen acetilación, metilación, ubiquitilación y sumoilación (Figura 4B) (Dryhurst et al., 2009).

Ambas isoformas H2A.Z.1 y H2A.Z.2 son acetiladas en su extremo amino terminal en las lisinas K4, K7 y K11. Además H2A.Z.1 es acetilada en la lisina K13. Como se explicó antes la acetilación debilita las interacciones entre en ADN y las histonas favoreciendo una conformación más abierta de la cromatina por lo que funcionalmente estas PTMs promueven la activación de la transcripción (Dryhurst et al 2009). El extremo amino de H2A.Z también es monometilado en los residuos de lisina K4 y K7 por la histona metiltransferasa SETD6, debido a que estas PTM bloquean la acetilación en los mismos residuos donde es acetilada se ha propuesto que la metilación en estos residuos es una marca que media el silenciamiento transcripcional (Sevilla & Binda, 2014). Finalmente tanto la isoforma H2A.Z.1 como la H2AZ.2.1 presentan sitios de ubiquitilación en su extremo carboxilo, específicamente en los residuos de lisina K120, K121, y K125, en contraste la isoforma H2AZ.2.2 que es más corta en su extremo carboxilo no presenta estos sitios de ubiquitilación. Sin embargo experimentalmente solo ha sido demostrada la ubiquitilación de los residuos K120, K121 y K125 en la isoforma H2AZ.1 por la subunidad RING1B del complejo represivo policomb 1 (PRC1). La ubiquitilación permite mantener el balance entre la represión y activación en los genes bivalentes, éstos son genes que codifican para la mayoría de los reguladores del desarrollo en las células troncales embrionarias, la principal característica de los genes bivalentes es que sus promotores se encuentran enriquecidos tanto con marcas activación (H3K4me3), como con marcas represivas, (H3K27me3), lo que les permite mantenerse silenciados

pero listos para expresarse durante el proceso de diferenciación. Esta modificación en el extremo carboxilo terminal no ha sido observada para la isoforma H2A.Z.2. (Surface et al., 2016).

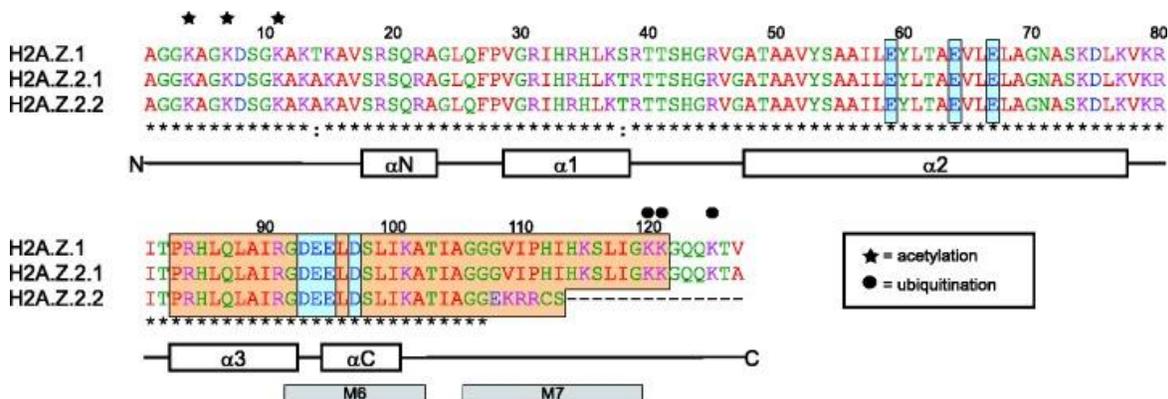


Figura 4. Alineamiento de las isoformas de variante de histonas H2A.Z.

Las isoformas H2AZ.1 y H2AZ.2.1 difieren en solamente tres aminoácidos indicados por dos puntos (posición 15, 39 y 128). Por su parte la isoforma H2AZ.2.2 en su extremo carboxilo terminal presenta sus mayores diferencias ya que tiene una delección de 13 aminoácidos y además tiene seis residuos de aminoácidos diferentes a las otras 2 isoformas.

1.7 H2A.Z: UNA VARIANTE DE HISTONA ONCOGÉNICA

En varios tipos de cáncer se ha encontrado que la histona H2A.Z está sobre-expresada. Tal es el caso del cáncer de próstata, mama, vejiga, melanoma maligno y cáncer de hígado (Vardabasso et al., 2014).

De manera más específica tanto en cáncer de vejiga como en melanoma se ha demostrado que H2A.Z regula la expresión de genes involucrados en proliferación celular (Kim et al., 2013; Vardabasso et al., 2015). Actualmente se sabe que, en el 13 al 52% de los casos de melanoma maligno, el incremento en la expresión de H2A.Z se debe al aumento en el número de copias de los genes *H2AFZ* y *H2AFV* respectivamente (Vardabasso et al., 2015).

En lo que respecta al cáncer de mama, la sobreexpresión de H2A.Z se debe a que el receptor ER α se enriquece en el promotor del gen de *H2AFZ* lo cual favorece su elevada tasa de transcripción (Hua et al., 2008). Adicionalmente la sobreexpresión de H2A.Z en células MCF7 (una línea celular de cáncer de mama), promueve significativamente la proliferación celular, en comparación con células que sobre expresan a la histona canónica H2A (Svotelis A. et al, 2010). Esto se debe a que los nucleosomas que contienen H2A.Z se enriquecen alrededor del TSS (sitio de inicio de la transcripción), de genes reguladores del ciclo celular generando una estructura de cromatina abierta que favorece la elevada expresión de oncogenes como YAP1 , CCND1 y del protooncogen Myc (Kim et al., 2013).

En el caso del cáncer de próstata los niveles totales de la variante H2A.Z están elevados debido a un aumento de la expresión de la isoforma H2A.Z.1. Al igual que en cáncer de mama la sobre expresión del gen H2A.Z.1 ocurre en parte por la unión del factor de transcripción c-Myc al promotor de *H2AFZ*. En este caso la isoforma H2A.Z.1 junto con el receptor de andrógenos regula la transcripción del gen PSA (antígeno específico de próstata). Además recientemente un análisis del epigenoma de las células epiteliales de próstata normal y células epiteliales de próstata transformadas permitió establecer que la isoforma H2A.Z.1 acetilada estaba asociada con oncogenes permitiendo su expresión, mientras que la isoforma H2A.Z.1 no acetilada se encontraba enriquecida en la región promotora de genes supresores de tumores y los cuales no se expresaban. Lo que indica que la histona H2A.Z.1 acetilada es necesaria para activar la expresión

del gen y que la presencia de la variante H2A.Z.1 por sí sola no es suficiente para activar la expresión gen (Dryhurst et al., 2009).

En lo que respecta a el carcinoma hepático, la isoforma H2A.Z.1 también se encuentra sobre expresada y tiene un papel crucial en la tumorigénesis hepática al promover la proliferación de las células tumorales, ya que regula positivamente la transcripción de genes que codifican para proteínas permisivas del ciclo celular como las cinasas dependientes de ciclina (CDK2, CDK4 y CDK6) y regula negativamente la expresión de los moduladores negativos del ciclo celular como p21 y p27 (Yang et al., 2016). Además de que la isoforma H2A.Z.1 también participa en la adquisición de un fenotipo invasivo al inducir la EMT. Esta isoforma regula de manera negativa la expresión de la E-cadherina, proteína que ya se mencionó, forma parte de las uniones adherentes célula-célula, por lo que niveles bajos de la E-cadherina conducen a la pérdida de las uniones adherentes entre las células epiteliales permitiendo que las células aumenten su movilidad iniciando de esta manera el proceso de EMT. Al mismo tiempo la isoforma H2A.Z.1 regula positivamente la expresión de la fibronectina (FN), la cual es una proteína de matriz extracelular que promueve la EMT (Yang et al., 2016).

En melanoma ambas isoformas (H2A.Z.1 y H2A.Z.2) se encuentran altamente expresadas, sin embargo se demostró que únicamente la isoforma H2A.Z.2 participa en la progresión tumoral. Esto se debe a que H2A.Z.2.1 promueve la expresión de los genes blancos del factor de transcripción E2F, los cuales codifican para ciclinas y otras proteínas regulatorias del ciclo celular promoviendo de esta forma el paso de la fase G1 a S (Vardabasso, Hake, & Bernstein, 2016). En las células de melanoma la isoforma H2A.Z.2.1 se encuentra enriquecida en las regiones promotoras de estos genes y a través del reclutamiento de la proteína de bromodominios Brd2 y E2F1 promueve la expresión de los genes blanco de E2F como las ciclinas y otras proteínas regulatorias del ciclo celular (Vardabasso et al., 2016).

Todos estos datos sugieren que la variante de histona H2A.Z actúa como un importante oncogen, al regular de manera positiva la transcripción de genes que participan en la proliferación y adquisición de un fenotipo invasivo y regulando negativamente a genes supresores de tumores (Vardabasso et al., 2016)

1.8 H2AZ Y ACDP

En el caso del ACDP, se desconocía si las variantes de histonas también contribuían en el desarrollo de esta enfermedad. Por lo que entonces, en el laboratorio se empezó a estudiar la participación de un mecanismo epigenético no analizado anteriormente en la biología del ACDP: las variantes de histonas. De las dos variantes analizadas (H2A.X y H2A.Z), se encontró que en líneas celulares de adenocarcinoma ductal pancreático (Capan1, BxPC3, Panc-1), existe una sobre-expresión del transcrito de H2A.Z con respecto a la línea celular de páncreas normal hTERT-HPNE. Otra demostración de la relación que existe entre la sobreexpresión H2A.Z y la tumorigénesis en ACDP, proviene de los resultados obtenidos del análisis inmunohistoquímico de 57 biopsias de pacientes con ACDP y 17 muestras de páncreas normal; en donde se encontró mediante inmunohistoquímica que a nivel de proteína H2A.Z está incrementada 3.0 veces más en biopsias de pacientes con ACDP en comparación con las biopsias de individuos sanos. Adicionalmente, y de manera aún más interesante, encontramos que la sobre-expresión de la histona H2A.Z es exclusiva de ACDP ya que en biopsias de pacientes con diabetes, pancreatitis aguda y crónica o con tipo de cáncer de páncreas diferentes al ACDP, los niveles de H2A.Z, son similares a los de las biopsias de individuos normales. Además mediante ensayos de qRT-PCR realizados en líneas celulares de ACDP se encontró que de forma diferente a lo descrito en los otros tipos de cáncer en donde esta isoforma está sobre-expresada, las tres isoformas (H2AZ.1, H2A.Z.2.1 y H2A.Z.2.2) están incrementadas con respecto a la línea celular de páncreas normal hTERT (Figura 5). Sugiriendo que en el ACDP las tres isoformas podrían promover la tumorigénesis en este tipo de cáncer.

Para investigar lo anterior, se realizó el silenciamiento de las tres isoformas de H2A.Z en la línea celular PANC-1 mediante un knockdown (KD), lo que permitió demostrar que la sobre expresión de las tres isoformas, H2A.Z.1, H2A.Z.2.1 y H2A.Z.2.2 permite superar una barrera oncoprotectora asociada con la senescencia. Este fenómeno ha sido definido como un estado en el que la célula pierde su capacidad replicativa, por lo que representa uno de los principales mecanismos fisiológicos que evitan la transformación de una célula normal a tumoral. Además también se demostró que tras el KD de las tres isoformas de H2A.Z las células PANC-1 se vuelven quimiosensibles reduciendo así el crecimiento tumoral *in vivo*.

Debido al papel importante que tienen cada una de estas isoformas en la progresión del ACDP, es que se vuelve interesante conocer los mecanismos moleculares que regulan la expresión de estos genes y/o en este caso de la sobreexpresión de estos genes. Si consideramos que H2A.Z es sobre expresada tanto a nivel de mensajero como a nivel de proteína, esto lleva a sugerir que la expresión de estos genes podría ser regulada en parte nivel de la transcripción.

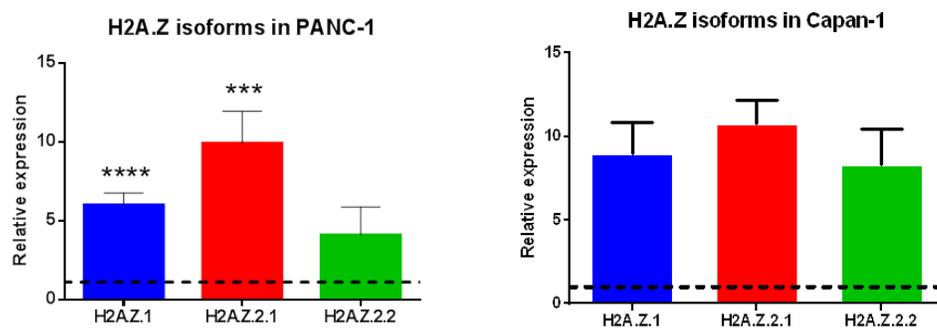


Figura 5. Niveles de expresión de las isoformas de H2AZ.

En las líneas celulares PANC-1 y Capan-1. Las 3 isoformas H2A.Z.1, H2A.Z.2.1 y H2A.Z.2.2 se encuentran sobre expresadas.

Hasta la fecha la única región promotora caracterizada ha sido la del gen H2A.Z.1. En este trabajo se encontró que el promotor proximal para H2AZ.1, se localiza 200 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS) y que está constituida por tres elementos CCAAT y dos elementos GGGCGG (cajas GC) (Figura 6). Mediante ensayos con el gen reportero de luciferasa se determinó que de estos elementos, las cajas CCAAT central y proximal así como el elemento distal GGGCGG son los que principalmente determinan la actividad transcripcional de la isoforma H2AZ.1. Además, se demostró que el factor de transcripción Sp-1 se une a los elementos GGGCGG (HATCH & BONNER, 1995).

En cuanto al gen H2AZ.2 (cuyo transcrito genera por *splicing* las isoformas H2A.Z.2.1 y H2A.Z.2.2) se desconoce cómo se regula su expresión a nivel transcripcional. Hasta la fecha no se ha determinado en donde se ubica el sitio de inicio de la transcripción de H2AZ.2 y por lo tanto no se ha podido establecer donde se ubica su región promotora y mucho menos que elementos *in cis* constituyen al promotor de este gen. En el 2009 Dryhurst, realizó un análisis *in silico* y comparó la región promotora del gen H2A.Z.1 con la región *upstream* del gen H2A.Z.2. Este análisis arrojó que tanto la región promotora de H2A.Z.1 así como una región de -433 pb (ubicada río arriba del ATG) del gen H2AZ.2 tenían una secuencia nucleotídica diferente y que por lo tanto la arquitectura de ambas regiones es completamente diferente. En el caso de H2A.Z.1 además de los elementos ya mencionados también se identificaron una caja TATA y un elemento de unión para el factor de transcripción c-Myc, cuyo papel en incrementar los niveles de transcripción de la isoforma H2A.Z.1 en el cáncer de mama y próstata ya ha sido demostrado experimentalmente (Dryhurst et al., 2009).

Para el caso del gen H2A.Z.2 este análisis mostró la presencia de sitios probables a los cuales se le podrían unir factores de transcripción como: c-Myc y N-myc. Sin embargo, para el caso de H2A.Z.2 los sitios de unión para c-Myc, están localizados en la posición (-115 con respecto al ATG), mientras que para la isoforma H2A.Z.1, el sitio de unión para este factor se localiza a -450pb (Figura 6) (Dryhurst et al., 2009).

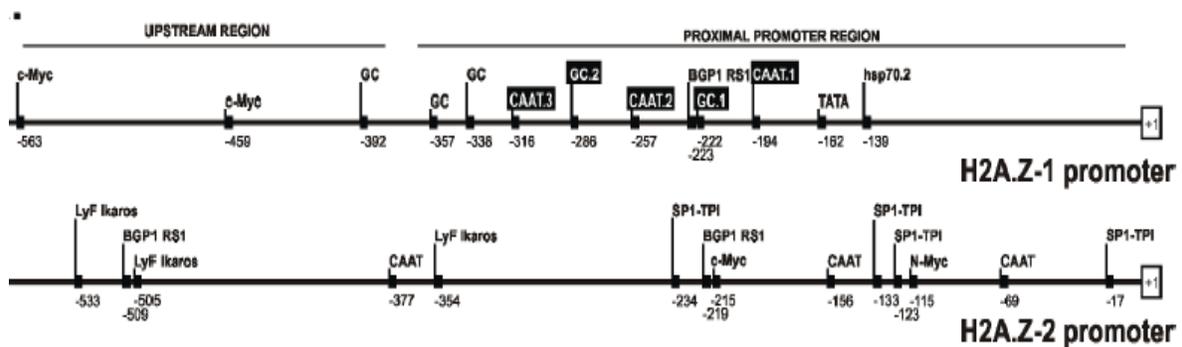


Figura 6 Diagrama del análisis in silico de los promotores H2A.Z.1 y H2A.Z.2.

En cajas negras se muestran los elementos que han sido demostrados experimentalmente. (Tomado de Dryhurst (2009).

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a que las isoformas de la variante de histona H2A.Z están sobre-expresadas tanto en biopsias de pacientes como en líneas celulares de ACDP y que ya se ha demostrado que esta sobre expresión está asociada con un fenotipo quimiorresistente y de células, es que se vuelve interesante conocer los mecanismos que regulan la expresión a nivel transcripcional del cual específicamente del gen H2A.Z.2 de cual aún no se caracterizado su promotor lo que nos permitiría comprender los mecanismos que regulan su expresión.

3. HIPÓTESIS

Los elementos en *cis* del promotor del gen H2A.Z.2 son diferentes a los elementos en *cis* del promotor del gen H2A.Z.1 por tanto diferentes factores en *trans* se podrían unir a ambos promotores.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL.

1. Identificar y caracterizar la región promotora del gen que codifica para la variante de histona H2A.Z.2

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar el sitio de inicio de la transcripción.
2. Caracterizar la región promotora del gen H2A.Z.2
 - 2.1 Determinar si la región *upstream* al sitio de inicio de la transcripción funciona como un promotor.
 - 2.2 Predecir los probables elementos en *cis* que constituyen a la región promotora del gen H2A.Z.2 mediante un análisis *in silico*.
 - 2.3 Establecer en donde se encuentra el promotor mínimo y los elementos regulatorios *upstream*.

CAPÍTULO II

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cultivo de células PANC-1

Durante la realización de este trabajo se utilizó la línea celular PANC-1 la cual es una línea celular de adenocarcinoma ductal pancreático. Ésta se empleó para la extracción del ADN genómico, ARN total, obtención de extractos nucleares y la realización de ensayos de gen reportero.

Brevemente las células PANC-1 fueron mantenidas en cultivo en cajas 100 mm CORNING con 7 mL de medio completo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), el cual fue preparado de la siguiente manera: inicialmente para preparar medio DMEM base se pesaron 13.535 g de “DMEM High glucose” en polvo de BIOWEST (Glucosa 4500 mg/L, L-glutamina 584 mg/L y piruvato de sodio) y se disolvió en 900 mL de agua mediante agitación, una vez disuelto, se adicionó 3.7 g de bicarbonato de sodio y se continuó agitando hasta su completa disolución para después llevar la solución a un volumen final de 1L. Esta solución fue esterilizada usando una unidad de filtración con una membrana de 0.22 μm de Millipore. Antes de su uso el medio DMEM base se suplementó con los mL necesarios de suero fetal bovino (SFB) de BIOWEST (# Cat. S1650) para llevarlo a una concentración final de 10% y con solución stock de penicilina-estreptomina 100X, de la cual se agregaron los mL necesarios para que estuviera a una concentración final 1X.

Las células se cultivaron en una atmósfera húmeda a 37°C con 5% CO₂. Se realizaron cambios del medio de cultivo cada 5 días o bien cuando éste cambiara a un color amarillo. Las células fueron mantenidas en estas condiciones hasta que alcanzaron una confluencia aproximada del 90%.

5.1.1 Pase de cultivo y crio preservación de células PANC-1

Una vez que las células alcanzaron la confluencia necesaria para sub cultivarlas, éstas fueron procesadas de la siguiente forma: se aspiró el medio de cultivo a la caja de cultivo donde se sembraron las células. Después se lavó la monocapa de células adicionando 3 mL de solución salina PBS 1X estéril (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.1 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄). Hecho lo anterior se retiró la solución de PBS 1X. Para desprender la monocapa de células se adicionó 2 mL de solución de tripsina al 0.25% - EDTA 0.53mM (GIBCO) y se incubaron a 37°C durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se verificó que se hubiera desprendido la monocapa de células observando al microscopio, y posteriormente se adicionaron 4 mL de medio DMEM completo para detener la acción enzimática de la tripsina. Hecho lo anterior, las células fueron transferidas a un tubo cónico de 15 mL en donde se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos. Después de la centrifugación se retiró el sobrenadante y el botón de células fue resuspendido en 1 mL de medio DMEM completo ya sea para realizar un pase de cultivo sin contar las células o para congelarlas. Cuando se requirió crio preservar a las células, aproximadamente 2×10^6 células/mL se transfirieron a crio viales y como agente crioprotector, para mantener la viabilidad y funcionalidad de las células, se adicionó DMSO estéril (dimetilsulfoxido) al 5% y se almacenaron a -80°C.

5.1.2 Sub cultivo de la línea celular PANC-1

Cuando se requirió de la siembra de un cierto número de células, el botón se resuspendió en 1 mL de solución PBS 1X estéril y se realizó el conteo de las células utilizando una cámara de Neubauer. Brevemente, para contar las células se tomaron 10 µL de la suspensión de células y se diluyó en 90 µL de azul de tripano, con la ayuda de la micropipeta se mezcló esta dilución. Se tomaron 10 µL los cuales se colocaron en la cámara de Neubauer. La cuadrícula de recuento de la cámara de Neubauer está formada por 9 cuadros grandes, pero únicamente se hizo el conteo de las células

presentes en los 4 cuadros de las esquinas. Hecho el conteo para calcular el número de células presentes en 1 mL de medio, el número total de células que se contaron se divide entre 4 (que son los 4 cuadros donde se contaron las células) y se multiplica por el factor de dilución y en seguida por el factor de la cámara (1×10^4). Finalmente, de acuerdo al número de células requerido se colocaron los microlitros necesarios en las cajas de cultivo.

5.2 Extracción de ADN genómico

Para la extracción del ADN genómico (ADNg) se utilizó el *Kit* “Genelute Mammalian genomic DNA” de SIGMA (# catálogo RTN70), este protocolo se basa en la purificación del ADN mediante el uso de una membrana de sílica. Inicialmente se adiciona al botón de células una solución que contiene una sal caotrópica la cual lisa a las células y desnaturaliza las macromoléculas, posteriormente la adición de etanol permite que el ADN se una a la membrana de sílica y después mediante varios lavados se eliminan contaminantes para que finalmente el ADN sea eluido.

Brevemente, una vez que las células alcanzaron una confluencia óptima (90%), éstas fueron procesadas de acuerdo a lo descrito en el punto 5.1.1 hasta que se obtuvo el botón de células. Después de retirar el sobrenadante, el botón de células se resuspendió en 200 μ L de solución estéril PBS 1X y se transfirieron a un tubo eppendorf en donde se adicionó 20 μ L de Proteinasa K y 200 μ L de la solución de lisis de SIGMA (sal caotrópica). El contenido de este tubo eppendorf se mezcló por vortex y para completar la lisis, las células se incubaron por 20 minutos a 56°C. Transcurrido este tiempo se adicionaron 200 μ L de etanol grado biología molecular (96%-100%) a la muestra y se mezcló por vortex durante 15 segundos. El contenido total del tubo fue transferido a una columna proporcionada por el *kit* (la cual previamente se insertó en un tubo colector) y se hizo pasar la muestra a través de la columna por lo que se centrifugó a 8,000 rpm durante 1 minuto, este paso de centrifugación fue repetido 2 veces más. Posteriormente se lavó la columna

adicionando 500 μL de la solución de lavado y se centrifugó a 8,000 rpm por 1 minuto, este paso de lavado se realizó dos veces. Después de los lavados la columna junto con el tubo colector se centrifugaron durante 1 minuto más a 14,000 rpm para eliminar las trazas de etanol. Finalmente, la columna fue colocada en un tubo eppendorf nuevo en donde para eluir el ADN se adicionaron 100 μL de H_2O libre de nucleasas (aunque la cantidad de agua puede variar de acuerdo al número de células), y se incubó la columna a 65°C durante 3 minutos. Transcurrido este tiempo el tubo colector junto con la columna, se centrifugaron a 14,000 rpm por un minuto. Después de la centrifugación el volumen total del filtrado fue recuperado del tubo colector (ya que este contiene el ADN) se transfirió a un tubo eppendorf nuevo el cual se etiquetó y se almacenó a -20°C hasta su uso.

La concentración del ADN se determinó utilizando el equipo Nanodrop por determinar la absorbancia de la muestra a 260 nm. La pureza del ADN se verificó calculando la relación entre la absorbancia 260/280 nm la cual fue mayor a 1.8.

5.2.1 Electroforesis en gel de agarosa

Para corroborar la integridad del ADN genómico se preparó un gel de agarosa al 1% para lo cual se pesaron 300 mg de agarosa los cuales se colocaron en un matraz y se adicionó 30 mL de Buffer TBE 0.5 X el cual fue preparado con una dilución 1:10 partir de una solución "stock" TBE 5X (TRIS 0.445 M, ácido bórico 0.444 M, EDTA 10mM). Esta mezcla fue calentada para fundir la agarosa y una vez fundida se le adicionó 1 μL de bromuro de etidio (BrEt) 10 mg/ml por cada 10 mL de la solución de agarosa (el BrEt es un molécula que se intercala entre las base nucleotídicas del ADN de doble cadena y que al exponerse a luz UV vuelve visible las moléculas de ADN). Posteriormente la solución de agarosa fue vertida en un molde donde se mantuvo hasta que la agarosa solidificó. Finalmente se tomó 1 μL de ADN al cual se le adicionó 1 μL buffer de muestra 6X que contiene dos

colorantes: azul de bromofenol y cianol xileno (con los cuales se pudo seguir la migración del ADN) y 4 μL de H_2O , esta muestra se tomó con una micropipeta y se colocó en uno de los pozos de gel de agarosa, como buffer de corrida se utilizó TBE 0.5X. Una vez que concluyó la electroforesis el gel de agarosa se expuso a la luz ultravioleta. La imagen del gel para observar la integridad del ADN se documentó utilizando el equipo MiniBis PRO de Bio-imaging Systems.

5. 3 Extracción del ARN total

Para realizar la purificación de ARN a partir de la línea celular PANC-1 se utilizó el “TRIzol Reagent” de INVITROGEN (# Cat.15596026). Este reactivo es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, el cual es un compuesto altamente desnaturizante que lisa las células, solubiliza sus componentes y simultáneamente desnaturiza las ARNasas endógenas evitando así la degradación del ARN (Chomczynski, 1993).

La purificación del ARN se realizó como se explica a continuación. Brevemente, de una caja de cultivo de 100 mm se cosecharon aproximadamente 1×10^6 células, para lo cual, a diferencia del procedimiento seguido para la extracción del ADN genómico no fue necesario obtener el botón de células, sino que únicamente se retiró el medio de cultivo y se lavó dos veces la monocapa de células con una solución de PBS 1X estéril y fría, preparada con agua DEPC (Dietil pirocarbonato). Después de los lavados se adicionó 1mL de “TRIzol reagent” directamente sobre la monocapa de células para lisarlas, luego de la adición de este reactivo se verificó que la monocapa se hubiera desprendido y se transfirió este mL de lisado celular a un tubo eppendorf en donde con la ayuda de una micropipeta se homogenizó el lisado celular. A este lisado celular se adicionó 200 μL de cloroformo por cada mL del “TRIzol reagent” y se mezcló utilizando vortex durante 15 segundos para después dejar incubando 3 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación se centrifugó la muestra a 12,000 g por 30 minutos a 4°C , en este paso de centrifugación se

observaron dos fases: una fase orgánica en la cual el ADN y proteínas son extraídas mientras que en la fase superior acuosa permanece el ARN. Por lo que entonces, la fase superior acuosa se transfirió a un tubo nuevo en donde se le adicionó 500 μL de isopropanol (por cada mL del "TRIzol reagent"), con lo cual el ARN fue precipitado, y se dejó incubando toda la noche a 4° C. Al día siguiente esta solución se centrifugó a 12,000 g por 30 minutos a 4° C, en este punto se observó la formación de una pastilla blanca en el fondo del tubo la cual corresponde al ARN. Se retiró el sobrenadante y la pastilla de ARN se lavó por adicionar 1 mL de etanol al 70% (este paso permite eliminar las sales) para nuevamente centrifugarlo a 10,500 g durante 10 minutos a 4°C. Hecho lo anterior se retiró el sobrenadante y la pastilla se dejó secando al aire (el tubo eppendorf se dejó sobre una sanita con la tapa abierta). Finalmente, con base al tamaño del botón del ARN fue la cantidad de H₂O DEPC que se utilizó para resuspender el botón de ARN. Al igual que con el ADN genómico la concentración del ARN fue determinada por utilizar el equipo Nanodrop leyendo la absorbancia de la muestra a 260 nm. Del volumen total en que se eluyó el ARN se prepararon varias alícuotas las cuales fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

5.3.1 Tratamiento con ADNasa I

Para asegurar que el ARN extraído no tuviera trazas de ADN se le dio un tratamiento con ADNasa I de la siguiente manera: En un tubo eppendorf de 1.5 mL se adicionó los microlitros equivalentes a 5 μg del ARN, 5 μl de "10X ADNasa Buffer" (100 mM Tris-HCl, 25 mM MgCl₂ 1 mM CaCl₂, pH 7.5) de INVITROGEN, 2 μl de ADNasa I "RNasa free" (1 U/ μl) de INVITROGEN y H₂O DEPC necesaria para llevar a un volumen final de 50 μl . Todos estos reactivos se mezclaron con la ayuda del vortex y se le dió un "spin" en la microcentrifuga, finalmente se dejó incubando la reacción a 37 °C durante 30 minutos en un baño María. Después de este tiempo de incubación, nuevamente se centrifugo brevemente el tubo y se le agregó 1 μL más de ADNasa I y se volvió a incubar a 37°C durante 15 minutos más.

Posteriormente, con el propósito de eliminar el ADN contaminante y subsecuentemente remover la ADNasa I y cationes divalentes de la muestra de ARN se adicionó a la reacción un décimo del volumen total de la reacción (50 μL) de la solución inactivadora de ADNasa I de INVITROGEN. Con esta solución, la muestra se dejó incubando 5 minutos a temperatura ambiente. Durante ese tiempo el tubo se agitó levemente con el dedo cada minuto. Por último el tubo se centrifugó a 10,000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante que contiene el ARN libre de ADN se transfirió a un tubo eppendorf nuevo y se cuantificó nuevamente en el equipo Nanodrop.

5.3.2 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Para corroborar que la muestra de ARN tratada con ADNasa I estaba libre de ADN se prepararon tres reacciones de PCR como a continuación se detalla en la tabla 1:

Tabla 1 Componentes de la reacción de PCR

Componentes de la reacción (reactivos de Thermo Scientific)	Cantidad
10X Taq Buffer (100mM Tris-HCl, pH 8.8, 500mM KCl, 0.8% v/v Nonidet P40)	1.25 μL
dNTPs mix 2.5 mM	1.6 μL
MgCl₂ 25mM	0.75 μL para una concentración final de 1.5 mM
Oligo sentido 10 μM	1 μL
Oligo antisentido 10 μM	1 μL
ARN (o ARN)	μL correspondientes a 100 ng
Taq DNA polimerase	0.25 μL
H₂O para un vol. final de 12.5 μL	---
Volumen final	12.5 μL

*Los componentes generales de la PCR en la que se utilizó esta ADN polimerasa recombinante (Thermo Scientific) fueron utilizados en las mismas cantidades para todas las PCR realizadas durante este trabajo con la misma enzima, por lo que de aquí en adelante esta tabla será la referencia.

En una de estas reacciones de PCR se utilizó como templado el ARN sin tratamiento con ADNasa I, en otra reacción se utilizó el ARN tratado con la ADNasa I (libre de ADN), mientras que en la última reacción se adicionó ADN genómico como templado. En estas reacciones se empleó un oligonucleótido sentido de secuencia 5'-3' TGGCGCGCATCCATTTACTA y un oligonucleótido antisentido de secuencia 5'-3' GGTCTCCCTAAGTCCCCGAA. Estos oligonucleótidos están diseñados para amplificar un fragmento de 90 pb del promotor del gen KRAS (Figura 7). De tal forma que únicamente se obtuvo el producto del tamaño esperado en las reacciones que se utilizó como templado el ADNg y el ARN no tratado, mientras que en la reacción en la que se utilizó como templado el ARN tratado con ADNasas I no se obtuvo el producto del tamaño esperado.

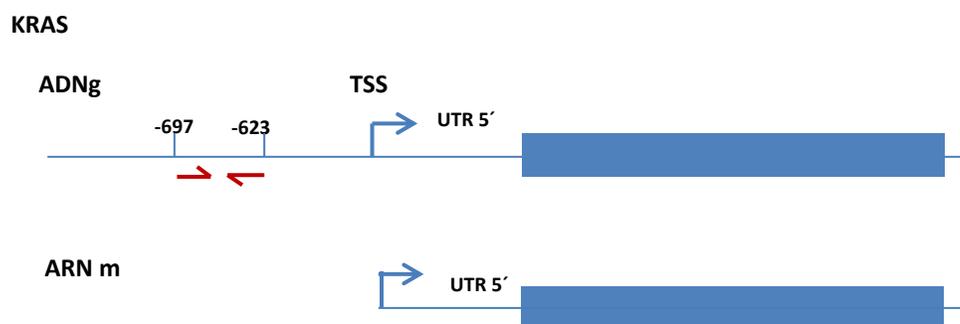


Figura 7 Oligos empleados para amplificar parte del promotor de KRAS

Las condiciones de amplificación fueron una temperatura de desnaturalización inicial de 95° C por 2 minutos; 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, una temperatura de alineación de 61°C por 30 segundos y una temperatura de extensión de 72°C durante 30 segundos, y un último ciclo de 5 minutos de a 72°C (extensión final). Los productos de estas reacciones de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa, para lo cual se preparó un gel de agarosa a una concentración del 2% pesando 600 mg de agarosa a los cuales se les adicionó 30 mL de buffer TBE 0.5X el resto del protocolo se realizó de acuerdo a lo descrito en el punto 5.2.1

5.3.3 Electroforesis de ARN en gel de agarosa desnaturalizante

Después del tratamiento del ARN con ADNasa I y con el propósito de evaluar la integridad del ARN, éste fue analizado mediante un gel de agarosa desnaturalizante de acuerdo al método descrito por Sue Kyes (2000). Para lo cual se preparó un gel de agarosa desnaturalizante al 1.2 % de la siguiente manera: se pesaron 360 mg de agarosa los cuales se colocaron en un matraz, después se midió y adicionó 30 mL de buffer TBE 1X, el cual se preparó a partir de TBE 5X diluyéndolo 1:5 con agua DEPC. Posteriormente para fundir la agarosa, se calentó el matraz que contiene la agarosa y el TBE 1X durante 35 segundos en un horno de microondas, para después dejarla enfriar a una temperatura aproximada de 55°C. Al alcanzar esta temperatura la agarosa, se adicionó 150 µL de una solución de isoticianato de guanidina preparada recientemente a una concentración final de 5 mM y se mezcló para después adicionar la agarosa fundida en el molde. Hecho lo anterior se dejó solidificar la agarosa durante 30 minutos. Al mismo tiempo se tomaron los µL equivalentes a 2 µg de ARN tratado con ADNasa I los cuales se colocaron en un tubo eppendorf y se agregó un volumen igual de formamida. Esta mezcla se calentó a 65°C durante 3 minutos para desnaturalizar el ARN y eliminar las estructuras secundarias. Finalmente, en una cámara de electroforesis se colocó el gel de agarosa al 1.2% y buffer TBE 1X, después de esto se cargó la muestra de ARN desnaturalizado en uno de los pozos en el gel. Adicionalmente en otro pozo del gel se colocaron 2 µL de buffer de muestra 6X el cual como ya se mencionó en el punto 5.2.1 contiene dos colorantes lo que permitió seguir visualmente la migración del ARN durante la electroforesis. La electroforesis se inició a 110 Volts por 15 minutos y después se disminuyó el voltaje a 70-80 V durante el resto de la corrida. Una vez que el azul de bromofenol del buffer de carga migró $\frac{3}{4}$ partes del gel se detuvo la electroforesis, y posteriormente para teñir el ARN y poder visualizarlo, el gel se colocó en una solución de bromuro de etidio (BrEt) a una concentración 0.5 µg/mL, la cual se preparó disolviendo 5 µL de la solución stock de BrEt 10 µg/µL

en 100 mL de agua DEPC. El gel se mantuvo en agitación en esta solución de BrEt durante 10 minutos. Para desteñir el gel, éste se colocó durante un minuto en un recipiente que contenía buffer TBE 1X. Finalmente el ARN pudo ser visualizado utilizando el equipo MiniBis PRO de Bio-imaging Systems en el cual se documentó la fotografía del gel.

Una vez que se corroboró la integridad del ARN, las muestras de ARN fueron mantenidas a -80°C hasta su uso.

5.4 Retro-transcripción reversa del ARN

Con el propósito de sintetizar ADN complementario (ADNc) a partir de la muestra de ARN libre de ADN para posteriormente utilizarlo como templado en reacciones de PCR, se utilizó oligo(dT) de Invitrogen. Este oligonucleótido hibrida con la cola de poli A de los ARN poli-adenilados, de esta manera y con la ayuda de la enzima retro transcriptasa reversa se sintetiza el ADN complementario a los ARN poli-adenilados.

La reacción se preparó en un microtubo de PCR adicionando: 1.5 μL de Oligo dT (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 1 μL de dNTPs mix 10mM y los microlitros equivalentes a 1.5 μg de ARN. Esta mezcla se incubó a 70°C durante 5 minutos en el termociclador y después de este tiempo se agregaron los reactivos en el siguiente orden: 2.5 μL DTT 0.1 M (ditiotreitól), 5 μL de 5X "First strand Buffer" (250 mM Tris-HCl pH 8.5, 375 mM KCl, 15 mM MgCl), y H_2O DEPC para llevar la reacción a un volumen final de 25 μL . Posteriormente la reacción se incubó a 42°C por 2 minutos. Una vez que transcurrió este tiempo se adicionó 1 μL de la transcriptasa reversa "SuperScript II" de Invitrogen, y enseguida se mezcló el contenido del tubo mediante vortex y un "spin" en la micro centrifuga y se dejó incubando a 42°C durante 90 minutos. Para terminar la reacción se incubó a 70°C por 5 minutos, finalmente el ADNc obtenido se cuantificó mediante Nanodrop.

5.5 Análisis *in silico* para la búsqueda de marcas epigenéticas

Se realizó una búsqueda *in silico* para las marcas de histona H3K4me3, H3K9ac, así como de nucleosomas que contienen a la variante de histona H2A.Z.2 en el extremo 5' gen H2A.Z.2 para lo cual se empleó la base de datos "Integrative genomics Viewer" (IGV) <https://software.broadinstitute.org/software/igv/> lo anterior permitió delimitar la localización probable del sitio de inicio de la transcripción (TSS del inglés *Transcriptional start site*).

5.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el mapeo del extremo 5' del ADN

Para realizar el mapeo del sitio de inicio de la transcripción del gen H2A.Z.2 se realizaron cinco reacciones de PCR en las cuales se utilizó como templado el ADNc, y 5 oligonucleótidos sentido localizados a 205, 289, 309, 366 y 514 pb río arriba del ATG de este gen (cuyas secuencias y localización se muestran en la tabla 2 y figura 2 respectivamente) y un oligonucleótido anti sentido localizado a 93 río arriba del ATG, figura 2, el cual se empleó para cada una de estas reacciones. Las reacciones de PCR fueron preparadas en microtubos de PCR con los mismos componentes generales ya descritos en la tabla 1 y la temperatura de alineación (Ta) para cada una las reacciones se determinó de acuerdo a la Ta más baja de cada par de oligonucleótidos mismas que se indican en la tabla 2. El resto de las condiciones de amplificación se detallan a continuación:

No. de ciclos	Etapa	Temp °C	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95	2 min
35 ciclos	Desnaturalización	95	30 seg
	Alineación	---	30 seg
	Extensión	72	30 seg
1 ciclo	Extensión final	72	5 min

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR para el mapeo del sitio de inicio de la transcripción

Tabla 2 Oligos empleados en las reacciones de PCR para el mapeo del TSS

Estrategia experimental	Nombre del oligo	Secuencia 5'-3'	Ta
Mapeo del Sitio de inicio de la transcripción	Fwd UTR 5'-3	CTG GCT AGA AGG AGG CGC GC	63°C
	Fwd-up-TSS	GCG AGG CG TCC AAT CTC ATT	59°C
	Fwd-KpnI-1-200	AGT CAC TAT TGG GGC TGG AGG	57°C
	Fwd-KpnI-500	GTC TCA GAA GCG GGA AAA CCAA	61°C
	Rvs-HindIII-2	CGC CGG AGC CGG ACA ATA C	59°C

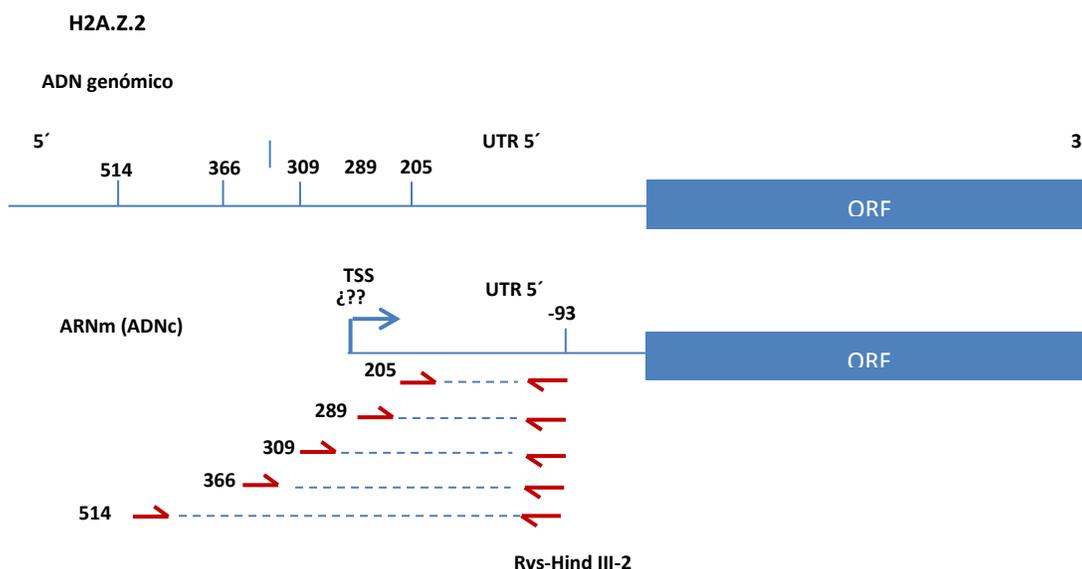


Figura 8 Localización de los oligonucleótidos utilizados para el mapeo del TSS.

Se emplearon 5 oligos sentido localizados a una distancia de 205, 289, 309, 366 y 514 pb río arriba del ATG

Adicionalmente se prepararon otras cinco reacciones de PCR en las que, a diferencia de las ya descritas se utilizó como templado el ADN genómico, esto se hizo con el propósito de corroborar que los oligonucleótidos empleados en estas PCRs amplificaran y se descartó que en caso de no amplificar en las reacciones que contenían ADNc como templado fuera por un problema con los

oligos. Después de la PCR las reacciones fueron analizadas por migrar los amplicones en un gel de agarosa al 1.2 % de acuerdo a lo descrito en el punto 5.2.1.

5.7 Amplificación rápida del extremo 5' del ADNc (RACE 5')

Con el objetivo de determinar con exactitud el nucleótido que corresponde al TSS se utilizó el sistema RACE 5' (por sus sigla del inglés *Rapid Amplification of cDNAs Ends*). Esta técnica permite caracterizar la secuencia desconocida del extremo 5' de los ARN mensajeros que tienen un bajo número de copias, por tanto es una técnica ideal para determinar el sitio de inicio de la transcripción.

5.7.1 Síntesis de ADNc oligo específico

Para realizar esta técnica se utilizó el "RACE 5' system" de INVITROGEN (# Cat. 18374-058) de acuerdo al protocolo descrito por el proveedor. Brevemente, como primer paso para la síntesis del ADNc se preparó una reacción en un microtubo para PCR con los siguientes componentes: se adicionó de 1-5 µg de ARN tratado con ADNasa I, 1 µL del oligonucleótido anti sentido Rvs-Hind III-2 de concentración 10pmol/µL específico para el ARNm de la variante de histona H2A.Z.2 (cuya secuencia y localización se indican en la tabla 3 y figura 3), y H₂O DEPC para llevar la reacción a un volumen final de 15.5 µL. Los componentes de la reacción se mezclaron mediante vortex y se le dio un "spin" en una micro centrifuga y después se incubó 10 minutos a 70°C en el termociclador, con el propósito de desnaturalizar el ARN. Transcurrido este tiempo de incubación el tubo se colocó en hielo durante 1 minuto, y se adicionó al tubo de PCR 2.5 µL de "10X Buffer PCR" (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 2.5 µL de MgCl₂ 25mM, 1µL de un mix dNTPs 10mM y 2.5 µL de DTT 0.1 M (todos estos reactivos son proporcionados en el *Kit* RACE 5' de INVITROGEN). La mezcla se colectó mediante una breve centrifugación y se incubó 1 minuto a 42°C y finalmente se agregó 1µL de la enzima transcriptasa reversa "Superscript II" (200 units/µl), también proporcionada en

el *kit*. Esta reacción fue incubada durante 50 minutos a 42°C, después de este tiempo y para inactivar la “Superscript II”, el tubo se incubó a 70°C por 15 minutos. Posteriormente el ARN usado como templado para la síntesis del ADNc se degradó, por adicionar 1 µL de ARNasa *mix* el cual es una mezcla de ARNasa H y ARNasa T1. La ARNasa H degradó el ARN que se encuentra formando moléculas híbridas ARN/ADN mientras que la ARNasa T1 degradó ARN de cadena sencilla, con lo cual se evitó la posible renaturalización ARN-ADNc.

Tabla 3 Oligos utilizados en la técnica RACE 5´

Nombre del oligo	Secuencia 5´- 3´	Ta
Rvs-Hind III-2	CGC CGG AGC CGG ACA ATA C	59°C
Rvs-Hind-III-1 (anidado)	CCG CTT GTC TTG CTG GTT CGA	59°C
AAP (Abridged Anchor Primer)	GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC(G) ₁₄	113°C

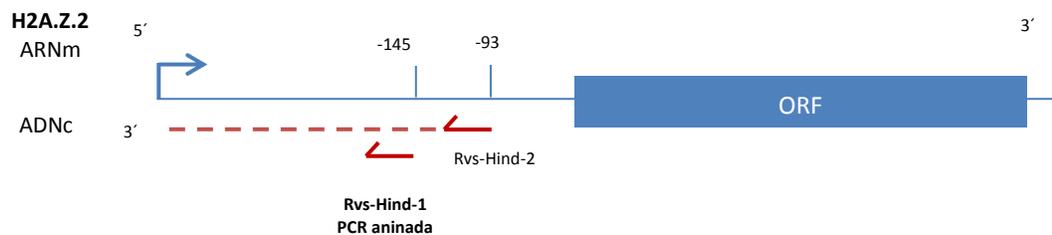


Figura 9 Localización de oligos gen específico empleados en el RACE 5´

Para la síntesis del ADNc se utilizó el Rvs-2 que está localizado a 93 pb río arriba del ATG, el oligo Rvs-1 se empleó para llevar a cabo la PCR anidada.

5.7.2 Adición del tracto homopolimérico de citosinas

Una vez que se sintetizó el ADNc oligo específico se procedió al segundo paso de la técnica RACE 5' el cual consistió en la adición de un tracto homopolimérico de citosinas en el extremo 3' del ADNc para lo cual a un microtubo de PCR se adicionaron los siguientes componentes: 5µl de "Buffer tailing 5X" (50 mM Tris-HCl pH 8.4, 125 mM KCl, 7.5 mM MgCl₂), 2.5 µl de dCTPs 2mM, (proporcionados en el *Kit*), 5.2 µl del ADNc oligo específico sintetizado en el paso anterior y H₂O DEPC para llevar la reacción a un volumen final de 24 µl. Esta mezcla se incubó por 3 minutos a 94°C en el termociclador y finalizado el tiempo de incubación, el tubo se colocó durante 1 minuto en hielo, se centrifugó brevemente y se adicionó 1 µl de la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT 20 U/µL) y se llevó la reacción a un volumen final de 25 µl. Esta reacción se incubó durante 10 minutos a 37 °C y finalmente la enzima TdT fue inactivada por calor a 65°C durante 10 minutos.

5.7.3 PCR del ADNc- dCTPs-3'

Una vez que se adicionó el adaptador de citosinas al ADNc en su extremo 3' (ADNc-dCTPs-3'), y con el objetivo de conocer las secuencias localizadas entre el adaptador de citosinas y el oligo específico (Rvs-Hind III-2), se realizó una PCR con el propósito de amplificar esta secuencia. La reacción fue preparada como se describe a continuación: brevemente, en un microtubo para PCR se adicionó 2.5 µL de Buffer PCR 10X, 1.5 µL de MgCl₂ 25 mM, 0.5 µL de dNTPs mix 10mM, 1 µL del mismo oligo antisentido específico utilizado para la síntesis del ADNc, 1 µL del oligo sentido AAP (Abridged Anchor Primer proporcionado en el *Kit* "RACE 5'system") que es complementario al adaptador de citosinas, como templado se agregó 2.5 µL del cDNA-dCTPs-3' y 16 µL de H₂O para llevar la reacción a un volumen final de 25 µL. Después de la adición de estos componentes se agregó 0.5 µL de la enzima *Taq* ADN polimerasa 5U/µL de Thermo Scientific (# Cat. EP0402). Las condiciones de amplificación para esta reacción fueron:

No. De ciclos	Etapa	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
35	Desnaturalización	95 °C	30 seg
	Alineación	59°C	30 seg
	Extensión	72°C	30 seg
1	Extensión final	72°C	5 min

El producto de esta PCR fue analizado mediante una electroforesis en gel de agarosa de acuerdo a lo descrito en el punto 5.2.1

5.7.4 PCR anidada

Con el objetivo de corroborar la especificidad del amplicón obtenido de la reacción anterior se realizó una segunda PCR en donde el ADN templado fue el amplicón obtenido en la primera PCR. La reacción de PCR se preparó como se describió para la primera PCR, pero a diferencia de la primera se utilizó un 1 µL de un oligonucleótido anti sentido anidado (Rvs-Hind-1, Figura 9) y el oligo AAP. Las condiciones de reacción fueron las descritas para la primera PCR. Finalmente el producto de esta PCR fue analizado mediante electroforesis en un gel de agarosa tal como se describió en el punto 5.2.1

5.8 Secuenciación del producto RACE 5´

Con el propósito de conocer la secuencia amplificada y de esta manera poder determinar la posición +1 o el TSS, el producto de esta segunda PCR se secuenció utilizando el oligonucleótido Rvs-Hind-1.

5.9 Amplificación del promotor de H2A.Z.2

Con el propósito de amplificar parte de la región *upstream* del gen H2A.Z.2 se obtuvo la secuencia nucleotídica de esta región a partir de la base de datos NCBI/Pubmed (número de referencia NC_000007.14). Con base a esta secuencia se diseñó un oligonucleótido sentido, al que se le dio el

nombre de “Fwd-1500”, que está localizado a 1514 pb río arriba del ATG y un oligonucleótido anti sentido, Rvs-Hind III-2, localizado a 93 pb río arriba del ATG. De tal forma que mediante PCR se amplificó un fragmento de 1421 pb (Figura 10), las secuencias de estos oligonucleótidos sentido y anti sentido están indicadas en la tabla 4. Además con el objetivo de realizar la clonación dirigida de este fragmento en el vector pGL3-Basic, a estos oligos sentido y anti sentido se les adicionó los sitios de restricción para las enzimas Kpn I y Hind III respectivamente.

5.9.1 Amplificación de sub fragmentos de la región F-1500 del promotor del gen H2A.Z.2

Adicionalmente con el propósito de determinar donde se localiza el promotor mínimo y las secuencias regulatorias presentes en el fragmento de 1421 pb (F-1500), se amplificaron fragmentos cada vez más cortos en su extremo 5´ mediante PCR. Para lo cual, se diseñaron cinco oligonucleótidos sentido localizados a una distancia de 1007, 510, 365, 309, 204 pb río arriba del ATG. Estos oligonucleótidos contienen también en su extremo 5´ el sitio de restricción para Kpn I. Para la amplificación de cada uno de estos fragmentos se utilizó el mismo oligonucleótido anti sentido (Rvs-HindIII-2) que se empleó para la amplificación del fragmento de mayor tamaño (1421 pb) y al que se le adicionó el sitio de restricción para Hind III. La localización y secuencias de estos oligonucleótidos se muestran en la Figura 10 y Tabla 4.

Para la amplificación de los fragmentos F-1500, F-1000, F-500 (Tabla 4) se utilizó la enzima “GoTaq DNA polimerase” de PROMEGA (# Cat. M3001). Cada reacción de PCR se preparó adicionando en un microtubo de PCR los siguientes reactivos:

Componente	Cantidad
5X Green GoTaq Reaction Buffer	4 μ L
dNTPs mix 2.5 mM	1.6 μ L
Oligo sentido (10 pmol)	1 μ L
Oligo antisentido (10 pmol)	1 μ L
ADN genómico de PANC-1	100 ng
“GoTaq DNA polimerase” (5U/ μ L)	0.25 μ L
H ₂ O para 20 μ L	---
Volumen final	20 μ L

Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes:

No. De ciclos	Paso	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
35	Desnaturalización	95 °C	30 seg
	Alineación	59°C para F-1500, 61.3°C para F-500 y 1000	30 seg
	Extensión	72°C	1 minuto por cada Kb
1	Extensión final	72°C	5 min

Mientras que para la amplificación del F-250, F-200, F-113 se utilizó la enzima “Phusion High Fidelity” de Thermo Scientific (# Cat. F-530XL), cada reacción se preparó con los siguientes componentes:

Componente	Cantidad
5X Phusion HF Buffer	4 µL
dNTPs mix 2.5 mM	1.6 µL
Oligo sentido (10 µM)	1 µL
Oligo antisentido (10 µM)	1 µL
ADN genómico de PANC-1	100 ng
Phusion HiFi polimerase (Thermo Scientific) (2U/ µL)	0.2 µL
H ₂ O para 20 µL	---
Volumen final	20 µL

Las condiciones de amplificación para estas reacciones fueron:

No. De ciclos	Paso	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	98°C	30 seg
35	Desnaturalización	98 °C	10 seg
	Alineación	59°C para F-200 F-113 y 57°C para F-250	30 seg
	Extensión	72°C	30 seg
1	Extensión final	72°C	5 min

Además de los productos anteriores de PCR, se amplificaron otros dos fragmentos más de la región *upstream* del gen H2A.Z.2 de un tamaño de 735 pb cada uno, para lo cual se utilizó un oligonucleótido sentido, “Fwd-SOXmut”, localizado a 827 pb río arriba del ATG el cual contiene 9 nucleótidos cambiados respecto a la secuencia *wildtype* reportada en la base de datos Pubmed

(los cuales aparecen resaltados en color rojo en la Tabla 4. Esto se hizo con el objetivo de modificar los motivos de unión para un factor de transcripción que están presentes en esta región del promotor. El segundo fragmento se amplificó con el mismo oligonucleótido, salvo que este contiene la secuencia *wildtype*. Para la amplificación de estos fragmentos también se utilizó la enzima “Phusion High Fidelity”, por lo que se utilizaron los mismos componentes así como las condiciones de amplificación ya descritos para la amplificación de F-250, F-200, F-113.

Por último, se amplificó un fragmento de 1221 pb, para lo cual se utilizó el oligonucleótido sentido “Fwd-1500” pero a diferencia de los anteriores fragmentos amplificados, se utilizó como oligonucleótido anti sentido “Rvs-upTSS-Hind III”, el cual está localizado a una distancia de 292 pb hacia el extremo 5´ relativo al ATG. Esto se hizo con el propósito de determinar si la región ubicada río abajo del oligo “Rvs-upTSS-Hind III” contiene el promotor mínimo.

Después de las PCRs, las reacciones fueron analizadas mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% tal como se describió en el punto 5.2.1. Una vez que se corroboró que los productos de la PCRs tuvieron el tamaño esperado, las bandas de los fragmentos amplificados fueron cortadas del gel de agarosa y se colocaron en un tubo eppendorf para posteriormente purificar el ADN amplificado.

5.9.2 Purificación de los productos de PCR a partir de gel de agarosa

Para realizar la purificación de los productos de PCR se utilizó el *Kit* “High Pure PCR product purification” de ROCHE Life Science (# Cat. 11 732 668 001). Este *Kit* está basado en un principio similar al del método empleado para la extracción del ADN genómico ya que para purificar los productos de PCR del gel de agarosa una vez que son liberados del gel de agarosa se hacen pasar por una columna de sílica en la cual el ADN se une.

La purificación se realizó de la siguiente manera: brevemente, se determinó el peso de los fragmentos de agarosa pesando un tubo eppendorf vacío y después se pesó el tubo contenía los fragmentos de agarosa, con base a este peso se adicionó 300µL del “binding buffer” (3 M Tiocianato de guanidina, 10 mM Tris-HCl, 5% etanol (v/v), pH 6.6) por cada 100 mg de agarosa. Posteriormente con el propósito de disolver la agarosa y liberar el ADN esta mezcla se incubó a 65°C por 10 minutos y durante ese tiempo cada dos minutos se mezcló la solución utilizando el vortex. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 150 µL de isopropanol por cada 100 mg de agarosa, y después se mezcló el contenido de este tubo por vortex. Enseguida la solución se transfirió a una columna (que previamente se insertó en un tubo colector), y se centrifugó a 13000 rpm durante 30 segundos. Después de este paso de centrifugación se adicionaron 500 µL del Buffer de lavado (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5) sobre la columna y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 minuto. Se realizó un segundo lavado adicionando 200 µL del mismo buffer de lavado y se centrifugó a las mismas revoluciones por minuto (rpm). Para eliminar las trazas de etanol la columna se centrifugó un minuto más a las mismas rpm. Después la columna se insertó en un tubo eppendorf nuevo, y finalmente los productos de PCR se eluyeron adicionando 40 µL de H₂O libre de nucleasas.

Posterior a la purificación y para corroborar la integridad de los fragmentos se utilizó un décimo del volumen en que se eluyeron cada uno de los fragmentos amplificados y se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, una vez que se verificó su integridad se almacenaron a -20°C hasta su uso.

5.10 Clonación de los fragmentos del promotor

Con el objetivo de evitar la pérdida de producto de PCR ya purificado a consecuencia de los pasos subsecuentes de digestión y purificación, se empleó la estrategia de clonar directamente los

productos de PCR en un vector intermedio pGEM-T y/o pJET-1.2/*blunt*, las características de estos vectores se muestran en la Figura 11.

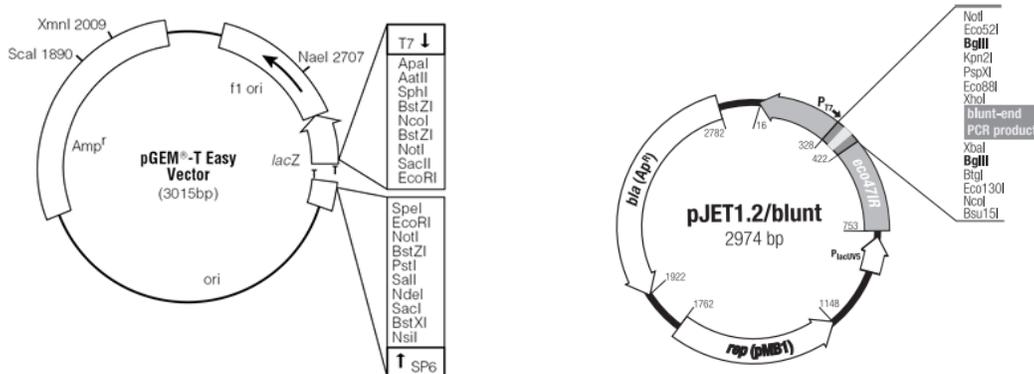


Figura 11 Vectores utilizados para la clonación de los fragmentos del promotor.

El vector pGEM-T es ideal para la clonación de insertos con una sola desoxiadenosina en sus extremo 3' ya que este vector contiene en su extremo 3' desoxitimidinas facilitando así la ligación del inserto. Mientras que el vector pJET 1.2 solo permite la ligación de insertos con extremo romos (*blunt*). Tomado de <https://assets.thermofisher.com> y worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-vector-systems

5.10.1 Ligación de los insertos en los plásmidos pGEM-T y pJET 1.2

Debido a que la enzima “GoTaq” que se utilizó para amplificar los fragmentos F-1500 F-1000 y F-500 tiene actividad de transferasa terminal no dependiente de templado con la cual se adiciona una única desoxiadenosina (dA) al extremo 3' de los productos amplificados. Estos fragmentos se clonaron utilizando el vector pGEM-T de PROMEGA (# Cat. A1360). Este vector contiene una desoxitimidina que sobresale en su extremo 3' lo cual lo vuelve adecuado para la ligación de insertos que en sus extremos 3' sobresale una dA (tal como se muestra en las Figuras 11 y 12).

A pesar de varios intentos para clonar el fragmento F-1500 en el pGEM-T, no se logró obtener la construcción en este vector, por lo que se optó por clonar este fragmento empleando el vector

pJET-1.2/*blunt*. Sin embargo este vector solo permite la ligación de insertos cuyos extremos son romos (*blunt*), por lo que antes de realizar la ligación del F-1500 al pJET-1.2/*blunt* se eliminó la *da* de ambos extremos 3' del amplicón "F-1500" por utilizar el *kit* "CloneJET PCR Cloning" de Thermo Scientific de la siguiente manera:

En un microtubo para PCR se adicionó 2 μL del "10X Buffer T4 DNA ligase" (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP pH 7.8), 2 μL del F-1500 purificado, 17 μL de H₂O libre de nucleasas y 1 μL de la enzima "DNA blunting". El contenido de este tubo se mezcló brevemente por vortex y se le dio un "spin". Hecho lo anterior el tubo se colocó en el termociclador donde se incubó a 70°C durante 5 minutos. Posteriormente se adicionó a la mezcla de reacción: 1 μL pJET1.2/*blunt* (50ng/ μL) y 1 μL de la enzima "T4 DNA ligase" (5U/L) y se dejó incubando toda la noche a 16°C en el termociclador.

Para realizar la ligación del F-1000 y F-500 la reacción de ligación fue preparada en un microtubo de PCR y se le adicionaron los siguientes componentes: 2 μL del "10X Buffer T4 DNA ligase", 1 μL del vector pGEM-T (50ng/ μL), más los μL necesarios de los fragmentos purificados para que la relación molar del inserto: vector fuera de 3:1, 1 μL de "T4 DNA ligase" de Thermo Scientific y H₂O suficiente para llevar la reacción a un volumen final de 20 μL la reacción. De igual manera la reacción se dejó incubando toda la noche a 16°C en el termociclador.

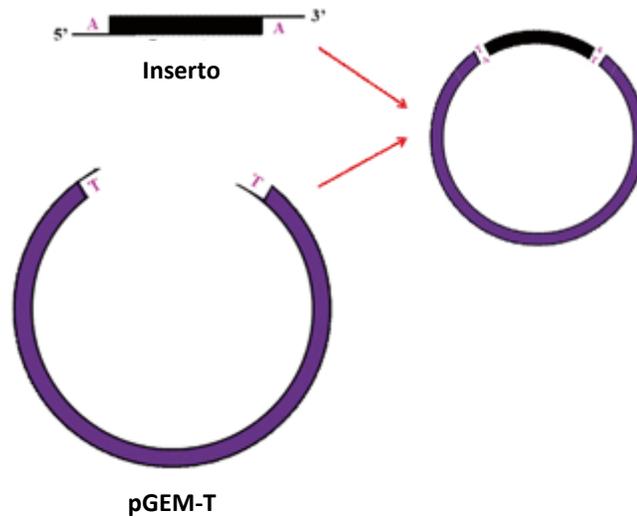


Figura 12 Estrategia de clonación utilizando el vector pGEM-T
Tomado de worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-vector-systems

5.10.2 Transformación de las células competentes

Una vez que los insertos fueron ligados a los plásmidos, con el propósito de transformar cada una de las construcciones generadas se utilizaron células competentes *E. coli* de las cepa XL-10 Gold y/o TOP 10. Estas cepas poseen un fondo genético que las hacen adecuadas para la clonación ya que ambas cepas tienen inactivado el gen *RecA* (recombinasa A) lo que disminuye la ocurrencia de recombinaciones en el ADN clonado, y por otro lado son deficientes de la endonucleasa I (*EndA*) mejorando así la calidad del ADN plasmídico obtenido, pero además de esto poseen otras características genotípicas que se enlistan en la Tabla 5.

Tabla 5 Genotipo de las células E. coli XL-10 Gold y Top 10

Tomado de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C404010>

TOP 10		XL 10 Gold	
Genotipo		Genotipo	
RecA1	forma inactiva del gen RecA (recombinasa A)	RecA1	forma inactiva del gen RecA (recombinasa A)
ΔEndA	Carece de endonucleasa I	ΔEndA	Carece de endonucleasa I
nupG	Este gen regulatorio permite la expresión constitutiva de genes de síntesis de desoxirribosas los cuales permiten la captación de plásmidos de gran tamaño.	Φ80lacZΔM15	
Φ80lacZΔM15	Carece de los aminoácidos del extremo amino del gen LacZ	Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173	Carece de todos los sistemas de restricción conocidos
hsdR	Eficiente transformación de productos de PCR no metilados	gyrA96	Mutación en el gen de la girasa de ADN, genera resistencia al ácido nalidíxico

Estas cepas fueron transformadas mediante el método de choque térmico el cual se basa en exponer a las bacterias con el ADN de interés a cambios de temperatura ocasionando la permeabilización de la pared celular de las bacterias y en consecuencia la introducción de los ácidos nucleicos (Chung, et al 1989).

Para efectuar la transformación se trabajó con un mechero para asegurar las condiciones de esterilidad necesarias, el protocolo se realizó como a continuación se describe: en un tubo de vidrio estéril se adicionó 100 μL de las bacterias competentes *E. coli* de la cepa XL-10 Gold y/o TOP 10 y 5 μL de la reacción de ligación, para mezclarlos se le dio unos golpecitos al tubo de vidrio en la parte inferior. Hecho lo anterior el tubo se dejó incubando 30 minutos en hielo, transcurrido ese tiempo el tubo se incubó por 2 minutos a 42°C y 1 minuto en hielo. Posteriormente se adicionó 1 mL de medio LB, preparado a partir del medio LB base en polvo de INVITROGEN (10g de peptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de cloruro de sodio por litro), al tubo de ensayo y se colocaron en agitación durante 1 hora a 250 rpm. Al terminar la hora de incubación se transfirió el contenido

del tubo a un tubo eppendorf estéril y se centrifugó 1 minuto a máxima velocidad en una microcentrífuga. Después de centrifugar, se retiraron 800 μL del sobrenadante y el botón de bacterias fue resuspendido en el resto del volumen (200 μL). Posteriormente las bacterias se colocaron sobre una placa agar-LB ampicilina (100mg/mL). La suspensión de bacterias colocada en estas cajas de LB-agar ampicilina se espatuló para distribuir homogéneamente las bacterias sobre la superficie. La adición de ampicilina a estas cajas permitió únicamente el crecimiento de colonias de bacterias que hayan incorporado ya sea el vector vacío o el vector con el inserto de interés. Las cajas de LB-agar ampicilina fueron incubadas durante 12 horas a 37°C para permitir el crecimiento de las colonias.

5.11 PCR de colonia

Para identificar las colonias que contenían el vector con el inserto de interés se realizó una PCR de colonia de la siguiente forma: cada reacción de PCR se preparó adicionando los componentes y las cantidades indicadas en la Tabla 1 (Sección 5.3.2), los oligonucleótidos y cantidades utilizadas de éstos fueron 1 μL del oligonucleótido sentido Fwd-500 (10pmol) y 1 μL del oligonucleótido anti sentido (10pmol) específico del vector, “Rvs-SP6” en el caso del pGEM-T o “Rvs pJET-1.2” para el vector pJET-1.2/*blunt* cuyas secuencias se muestran en las Tablas 4 y 6. Para adicionar el ADN de las bacterias de cada colonia, se picaron varias colonias que crecieron en la placa de agar (de una por una) con una punta de micropipeta de tal manera que con ese inóculo primero se picó otra placa de agar para generar una réplica de la placa y en seguida la punta de micropipeta se introdujo en el tubo de PCR donde se preparó cada una de las reacciones. Finalmente se adicionó la enzima *Taq* polimerasa (Tabla 1), se mezcló el contenido de los tubos con vortex y se colocaron en el termociclador con las siguientes condiciones de amplificación:

No. De ciclos	Etapa	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
35	Desnaturalización	95 °C	30 seg
	Alineación	48°C para pGEM-T-1000/500 y 63°C para pJET-1.2-1500	30 seg
	Extensión	72°C	30 seg
1	Extensión final	72°C	5 min

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en la PCR de colonia.

Vector	Oligonucleótido	Secuencia 5' -- 3'	Ta
pGEM-T	Rvs-SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG	43
	Fwd T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	43
pJET-1.2	Rvs- pJET-1.2	AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG	63
	Fwd- pJET-1.2	CG ACT CAC TAT AGG GAG AGC GGC	69

Después de la PCR los amplicones obtenidos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% de acuerdo a lo descrito en la sección 5.2.1 lo cual permitió identificar las colonias positivas.

5.12 Extracción del ADN plasmídico

Con el objetivo de extraer y purificar el ADN plasmídico de las construcciones clonadas, se prepararon cultivos con 10 mL de medio LB a los que se les adicionó 10 µL de ampicilina (100 mg/mL). Estos cultivos fueron inoculados con una única colonia positiva tomada de la placa réplica. El cultivo de bacterias se incubó a 37°C, con agitación a 250 rpm y durante ~14 horas para permitir que las bacterias alcanzaran una fase de crecimiento logarítmico.

Para la extracción del ADN plasmídico se utilizó el procedimiento descrito por Birnboim y Doly, 1979 y Ish-Horowicz; y Burke 1981. Este método se basa en la lisis alcalina de las bacterias

utilizando una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) e hidróxido de sodio (NaOH). El SDS es un detergente aniónico que rompe la pared celular de las bacterias y desnaturaliza las proteínas, mientras que el NaOH desnatura el ADN cromosomal y plasmídico. Esta mezcla es neutralizada con acetato de potasio lo que ocasiona que el ADN plasmídico covalentemente cerrado vuelva a alinearse, y que los “debris” celulares, proteínas, ADN cromosomal y el SDS formen un complejo con los iones de potasio lo que hace que precipiten después de un paso de centrifugación.

Se utilizó el *kit* “Zippy Plasmid miniprep” de ZYMO Research (# Cat. D4036), de acuerdo al protocolo descrito por el proveedor. Brevemente, los 10ml de cultivo bacteriano fueron transferidos a un tubo cónico de 15mL en donde las bacterias fueron colectadas por un paso de centrifugación a 4000 rpm durante 15 minutos. Después de centrifugar se retiró el sobrenadante y el “pellet” de bacterias se resuspendió en 600 μ L de Buffer TE (Tris 100Mm Ph 8.0, EDTA 10 mM), de este volumen se tomaron 300 μ L y se transfirieron a un tubo eppendorf para adicionarles 100 μ L del Buffer de lisis (0.2 N NaOH y SDS 1%), el tubo se mezcló por inversión 3 veces y se dejó reposando 2 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo se adicionaron 350 μ L del buffer de neutralización (acetato de potasio) y se mezcló por inversión hasta que se observó la formación de un precipitado amarillo y desapareció el color azul del buffer de lisis. En seguida el tubo se centrifugó a 13,000 rpm durante 4 minutos y posteriormente se transfirió el sobrenadante a una columna proporcionada por el *Kit* y se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 segundos. El material filtrado se descartó, ya que el ADN plasmídico quedó retenido en la silica que contiene la columna, para eliminar las impurezas de la columna se le agregó utilizando 200 μ L del “Endo wash buffer” (el cual contiene etanol) y se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 segundos. El filtrado se descartó y se realizó un segundo lavado para lo cual se adicionó a la columna 400 μ L del “wash buffer” y se centrifugó a 13,000 rpm por 30 segundos. Nuevamente la solución filtrada fue descartada y la columna se colocó en un tubo eppendorf nuevo para eluir el ADN plasmídico. Para

lo cual se agregó 50 μL de H_2O a la columna y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 minuto para recuperar en el sobrenadante el ADN plasmídico. Para corroborar la integridad del ADN plasmídico, de esta elución se tomó 1 μL , y se corrió en un gel de agarosa al 1% de acuerdo a lo descrito en el punto 5.2.1. La concentración del plásmido se determinó por emplear el equipo Nanodrop a una absorbancia de 260 nm y se guardó a -20°C hasta su uso.

5.13 Digestión de las construcciones pGEM-T-1000/500 y pJET 1.2-1500

Con el objetivo de corroborar la presencia de cada uno de los insertos en las construcciones generadas (pGEM-T-1000, pGEM-T-500 y pJET-1.2-1500) así como obtener suficientes cantidades de cada uno de los fragmentos F-1500, F-1000 y F-500, se realizó una doble digestión utilizando las enzimas Kpn I y Hind III, de la siguiente manera: en un tubo eppendorf se adicionó el volumen total en que se eluyó cada uno de los plásmidos purificados (pGEM-T-1000, pGEM-T-500 y pJET-1.2-1500), 7 μL del "10X NEbuffer 2.1" (500mM NaCl, 100mM Tris-HCl, 100mM MgCl_2) de *New England Bio Labs*, 2.5 μL de Kpn I (15 U/ μL), 2.5 μL de Hind III (10 U/ μL) de *New England Bio Labs*, 0.7 μL de BSA 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (albúmina de suero bovina) y agua para llevar la reacción a un volumen final de 70 μL . La reacción se dejó incubando 2 horas a 37°C . Concluido este tiempo, ya que la enzima Kpn I tiene solo 75% de actividad en el "NEbuffer 2.1" se adicionó a cada una de las reacciones 1 μL más de Kpn I y se dejaron incubando una hora más a 37°C . Finalmente todo el producto de la reacción de digestión fue analizado en un gel de agarosa preparativo a una concentración de 1%. Las bandas de ADN en el gel, correspondientes a cada uno de los fragmentos, fueron cortadas y se purificaron utilizando el *kit* "High Pure PCR product purification" de acuerdo a lo descrito en el punto 5.9.2. Una vez purificados los insertos se almacenaron a -20°C hasta su uso.

5.14 Doble digestión con las enzimas de restricción KPN I y HIND III

En el caso de los insertos F-250, F-200, F-113, F-1221, F-SOXWT y F-SOXMut se clonaron de manera directa en el vector pGL3-Basic sin necesidad de clonarlos en un vector intermedio. Para clonarlos de manera directa y dirigida en el pGL3-Basic una vez que se purificaron estos fragmentos después de la PCR, se realizó una doble digestión con las enzimas de restricción Kpn I y Hind III, las reacciones se prepararon de la siguiente manera: se adicionó el volumen total en que se eluyó cada uno de los fragmentos purificados, 1.5 μ L de Hind III, 2 μ L de Kpn I, 5 μ L del “10X NEBuffer 2.1”, 0.5 μ L de BSA 100X y se llevó la reacción a un volumen final de 50 μ L. La reacción se dejó incubando 2 horas a 37°C. Concluido este tiempo, se purificaron cada uno de los fragmentos digeridos con el *kit* “High Pure PCR product purification” de acuerdo a lo descrito en la sección 5.9.2. Después de la purificación se corroboró la integridad de los fragmentos digeridos tomando un décimo del volumen de la elución para analizarlos mediante electroforesis en gel de agarosa de acuerdo a lo descrito en el punto 5.2.1.

5.15 Clonación y sub clonación en el vector pGL3-Basic

5.15. 1 Digestión del plásmido pGL3-Basic

Simultáneamente, para permitir la clonación dirigida de los fragmentos F-250, F-200, F-113, F-1221, F-SOXWT y F-SOXMut previamente digeridos con las enzimas Kpn I y Hind III y la subclonación de los insertos F-1500, F-1000 y F-500 en el vector pGL3-Basic, se realizó la digestión de este plásmido con las enzimas de restricción antes mencionadas. La reacción se preparó adicionando: los μ L equivalentes a 5 μ g del plásmido (pGL3-Basic), 6 μ L de “10X NEbuffer 2.1”, 2.5 μ L de Kpn I, 2.5 μ L de Hind III, 0.6 μ L de solución de BSA 100X y se adicionó H₂O suficiente para llevar la reacción a un volumen final de 60 μ L. La reacción fue incubada por 2 horas a 37°C, transcurrido este tiempo se adicionó 1 μ L más de Kpn I y se volvió a incubar a 37°C por 1 h más.

Concluido este tiempo de incubación la reacción de digestión se corrió en un gel de agarosa al 1% y el plásmido digerido se purificó como se describió en la sección 5.9.2.

5.15.2 Ligación de los fragmentos al vector pGL3-Basic

Para realizar la ligación de cada uno de los fragmentos del promotor del gen H2A.Z.2 en el vector pGL3-Basic e incrementar la eficiencia de ligación, antes de preparar la reacción de ligación se realizó una electroforesis en gel de agarosa con una concentración entre 1 -2% (dependiendo del tamaño del inserto). En este gel de agarosa se corrió tanto el inserto como el plásmido y con base a este gel fueron calculadas las cantidades de inserto y vector para que la relación molar vector: inserto estuviera entre 1:1 a 1:10.

La reacción de ligación fue preparada adicionando: 2 μ L del 10X Buffer "T4 DNA ligase", cantidades del vector: inserto a una relación molar de 1:5 veces, 1 μ L de "T4 DNA ligase" y H₂O suficiente para llevar la reacción a un volumen final de 20 μ L. La reacción se incubó toda la noche a 16°C.

5.16 Transformación de las bacterias competentes

Con el propósito de clonar cada una de las construcciones generadas en el vector pGL3-Basic se utilizó células competentes de la cepa XL-10 Gold y/o TOP 10 y se transformaron de acuerdo al protocolo ya descrito en el punto 5.10.2.

5.17 PCR de colonia

Para identificar las colonias que contenían el vector con el inserto de interés se realizó una PCR de colonia de acuerdo a lo descrito en el punto 5.11 con la única diferencia de que en estas PCRs se utilizó para todas las reacciones el oligonucleótido anti sentido GLprimer2 de secuencia 5' CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA 3' el cual es específico para el vector y como oligonucleótido sentido para identificar las colonias positivas para las construcciones pGL3-Basic-1500, 1000 y 500

se utilizó el oligo Fwd-500. Mientras que para identificar las colonias positivas pGL3-Basic-250, 200, 113, 1221, SOXMut, SOXWT se utilizaron los oligonucleótidos sentido con los que fueron amplificados inicialmente cada uno de estos los fragmentos clonados (F-250, F-200, F-113, F-1221, SOXMut, SOXWT) ver Tabla 4.

5.18 Extracción del ADN plasmídico

Con el objetivo de extraer y purificar el ADN plasmídico de las construcciones clonadas en el vector pGL3-Basic, se prepararon cultivos con medio LB-ampicilina (100 mg/mL) los cuales fueron inoculados con una colonia positiva tomada de la placa réplica, el resto del protocolo se realizó conforme a lo descrito en el punto 5.12.

Para corroborar la calidad del ADN plasmídico purificado, se tomó 1 μ L, y se migró en un gel de agarosa al 1%. Posteriormente se el ADN se cuantificó utilizando el equipo Nanodrop por determinar la absorbancia a 260 nm y se guardó a -20°C hasta su uso.

5.19 Digestión de las construcciones pGL3-Basic-promotor H2A.Z.2

Una vez que se purificó el ADN plasmídico de cada una de las construcciones y para corroborar la presencia de los respectivos insertos se realizó una doble digestión con las enzimas Kpn I y Hind III. La cantidad de plásmido utilizada para digerir fue calculada con base al tamaño del inserto con respecto al vector de tal modo que la cantidad de inserto que pudiéramos obtener después de la digestión fuera de al menos de 100 ng lo que permitiría visualizarlo fácilmente. El resto del protocolo se realizó de acuerdo a lo descrito en el apartado 5.13. Posteriormente la reacción de digestión fue analizada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% para las construcciones con los inserto de mayor tamaño ó al 2% en el caso de los insertos más pequeños 196 y 113 pb.

5.20 Secuenciación de las construcciones pGL3-Basic

Al corroborar la liberación de los insertos del tamaño esperado, se procedió a secuenciar cada uno de las construcciones generadas en el vector pGL3-Basic, para lo cual se llevaron las muestras de cada uno de los plásmidos al departamento de fisiología celular de la UNAM. Para la secuenciación de cada una de las construcciones se utilizaron los oligonucleótidos descritos en la

Tabla 7:

Tabla 7 Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación de cada una de las construcciones en el vector pGL3-Basic

Construcción	Tamaño del inserto	Oligonucleótidos
pGL3-Basic-1500	1421 pb	Fwd-KpnI-1500, Fwd-KpnI-1000, Fwd-KpnI-500, GLprimer2 (Rvs)
pGL3-Basic-1000	915 pb	Fwd-KpnI-1000, Fwd-KpnI-500, GLprimer2 (Rvs)
pGL3-Basic-500	418 pb	Fwd-KpnI-500, GLprimer2 (Rvs)
pGL3-Basic-250	274 pb	GLprimer2 (Rvs)
pGL3-Basic-200	196 pb	GLprimer2 (Rvs)
pGL3-Basic-113	113 pb	GLprimer2 (Rvs)
pGL3-Basic-1221	1221 pb	Rvprimer3, Fwd-KpnI-1000, GLprimer2 (Rvs)
pGL3-Basic-SOX-WT	736 pb	Rvprimer3, Fwd-KpnI-500, GLprimer2 (Rvs)
pGL3-Basic-SOX-Mut	736 pb	Rvprimer3, Fwd-KpnI-500, GLprimer2 (Rvs)

5.21 Transfección transitoria de las células PANC-1

Con el objetivo de determinar si la región *upstream* del gen H2A.Z.2 es capaz de activar la transcripción así como realizar la caracterización funcional de los elementos regulatorios del promotor y analizar la localización del promotor mínimo se realizaron ensayos de gen reportero de luciferasa. Para esto las células PANC-1 fueron transfectadas utilizando el reactivo “Turbofect

reagent” de Thermo Scientific (# Cat. R0532). Este reactivo es una solución estéril de un polímero catiónico, el cual tiene una carga positiva lo que permite que forme un complejo con el ADN plasmídico que tiene una carga negativa, dando al complejo ADN-Turbofect un carga positiva general facilitando así la captación de estos complejos por las células.

La transfección se realizó como a continuación se describe. Brevemente, en una placa de 24 pozos fueron sembradas 5×10^4 células de la línea celular PANC-1. 24 horas después de que las células alcanzaron una confluencia de aproximadamente el 70%, éstas fueron transfectadas. Para esto inicialmente, se etiquetó debidamente varios tubos eppendorf estériles para cada una de las construcciones generadas en el vector pGL3-Basic. Luego se adicionó 100 μ L de medio DMEM base sin suero a cada uno de los tubos y 500 ng de cada una de las construcciones (al tubo correspondiente). Al mismo tiempo, se prepararon un par de tubos adicionales donde en cada uno de éstos se adicionaron 100 μ L de medio DMEM sin suero y 500 ng del plásmido pGL3-Basic vacío en un tubo y 500 ng del pGL3-Promoter en el otro tubo los cuales fueron utilizados como control negativo y positivo respectivamente. Además a todos los tubos también se adicionó 50 ng del vector pRL-SV40 (el cual fue utilizado como control interno para la normalización) y 2 μ L del “TurboFect Reagent”. Los componentes de la reacción de transfección fueron mezclados con la ayuda de la micropipeta subiendo y bajando lentamente el volumen total. La mezcla de transfección se dejó incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente lo cual permitió la formación de los complejos ADN-lípido. Transcurrido el tiempo de incubación, se adicionó 100 μ L de cada una de las mezclas de transfección a cada pozo y para asegurar una distribución homogénea del complejo ADN-lípido sobre la monocapa de células, la placa de 24 pozos se movió suavemente en círculos. Una vez transfectadas las células se dejaron incubando a 37°C durante 48 horas y pasado este tiempo se realizó el ensayo de luciferasa.

Se realizaron tres experimentos independientes en los cuales se realizó la transfección para cada una de las construcciones por duplicado.

5.22 Ensayo de gen reportero luciferasa

Este ensayo se basa en el uso de un vector reportero pGL3-Basic que contiene la secuencia codificante del gen de luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis*. Róo arriba de este gen se localiza el sitio de clonación múltiple o MCS (por sus siglas del inglés **M**ulti **C**loning **S**ite) en el cual se inserta la región promotora o secuencia de interés del gen que se quiere evaluar Figura 13. De tal manera que únicamente la ligación de una secuencia que funcione como un promotor hará que el gen de la luciferasa se exprese y que pueda ser detectado al medir la luminiscencia emitida por esta enzima la cual será proporcionar a la actividad transcripcional de la secuencia analizada. En este ensayo se utilizó un segundo vector reportero el pRL-SV40 el cual contiene el gen de la luciferasa de la *Renilla reniformis* con el cual fueron normalizados los resultados obtenidos.

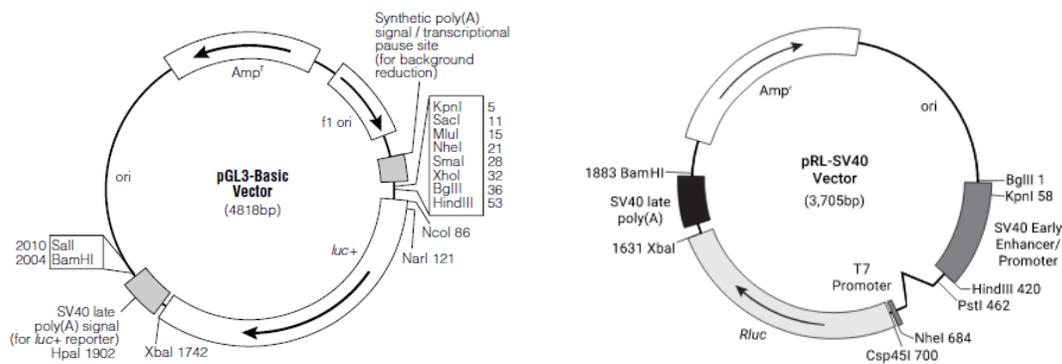


Figura 13 Vector pGL3-Basic y pRL-SV40.

El pGL3-Basic contiene la luciferasa de *Photinus pyralis*, carece de elementos regulatorios como un promotor o un enhacer y contiene el gen de resistencia a la penicilina lo que permite seleccionar las clonas de bacterias transformadas. Mientras que el pRL-SV40 contiene la luciferasa de *Renilla reniformis* cuya expresión esta conducida por el promotor T7.

Para realizar el ensayo de gen reportero de luciferasa se utilizó el *kit* “Dual Luciferase Assay System” de PROMEGA (# Cat. E1910), para lo cual 48 horas después de la transfección se aspiró el medio de cultivo de las células y se lavó cada uno de los pozos adicionando 1 mL de solución estéril de PBS 1X. Después de esto, se adicionó a cada pozo 100 µl del buffer de lisis pasiva (PLB 1X) y se incubaron 15 min a temperatura ambiente con agitación suave para permitir la lisis de las células. De este lisado se tomaron 20 µl y se colocaron en una placa de 96 pozos opaca, después se adicionó 20 µL del reactivo LARII que contiene el sustrato de la enzima luciferasa, la luciferina, e inmediatamente se introdujo la placa en el luminómetro (TECAN) para realizar la lectura de la luminiscencia emitida por cada una de las muestras. Una vez cuantificada la luminiscencia de la luciferasa (*Photinus pyralis*), se adicionó en cada uno de los pozos 20 µL del reactivo “Stop & Glo”, el cual contiene el sustrato de esta enzima y se midió la luminiscencia emitida por la luciferasa de la *Renilla reniformis*. Para normalizar los datos obtenidos se dividió la actividad de la luciferasa *Firefly* de una muestra particular entre la actividad de la luciferasa de la *Renilla reniformis* de la misma muestra. El valor obtenido fue utilizado para realizar las comparaciones entre muestras y graficar los resultados.

5.23 Análisis *in silico* para la predicción de sitios de unión a factores de transcripción

Para predecir los probables FTs que se unen al promotor del gen H2A.Z.2 se utilizaron cuatro bases de datos: TRANSFAC <http://genexplain.com/transfac/#section0>, TFBIND INPUT: <http://tfbind.hgc.jp/>, PROMO <http://algggen.lsi.upc.es>, UCSC GENOME BROWSER: <https://genome.ucsc.edu/>. De esta manera y para elegir los sitios de unión más confiables se seleccionaron únicamente aquellos que coincidieron en tres de cuatro programas.

CAPÍTULO III

6. Resultados

Recientemente nuestro grupo de trabajo encontró que ambas isoformas producto del gen H2A.Z.2 estaban sobre expresadas en el ACDP, y además se demostró que éstas promueven la progresión de esta enfermedad. Por lo tanto se vuelve importante estudiar los mecanismos moleculares que regulan su expresión (Ávila et al., 2016). Debido a esto el objetivo general de este trabajo consistió en identificar y caracterizar al promotor del gen H2A.Z.2. Por lo que inicialmente se determinó la posición “+1” o el sitio de inicio de la transcripción ya que se sabe que río arriba de esta posición, en los genes que son transcritos por la ARN polimerasa II, inicia el promotor del gen. Por lo tanto, su identificación era esencial para determinar dónde se localiza el promotor, para que posteriormente pudiéramos determinar los elementos regulatorios que lo conforman y que controlan la expresión del gen H2A.Z.2.

6.1 Determinación del sitio de inicio de la transcripción (TSS)

Como primera aproximación para determinar el sitio de inicio de la transcripción se realizó un análisis bioinformático utilizando la base de datos “Integrative Genomic Viewer” (IGV, <https://software.broadinstitute.org/software/igv/>) en dónde se buscó la presencia de varias marcas epigenéticas como la H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac así como de nucleosomas que contienen a la variante de histona H2A.Z río arriba del extremo 5' del gen H2A.Z.2. Se utilizaron estas marcas epigenéticas, ya que se sabe que éstas se encuentran enriquecidas alrededor de los sitios de inicio de la transcripción de los promotores de los genes activos (Li, Carey, & Workman, 2007). De tal manera que esta aproximación nos permitió delimitar una región donde posiblemente estaba localizado el TSS. Además de estas marcas de histonas también se buscó la presencia de sitios de hipersensibilidad a ADNasa (DHS por las siglas en inglés *DNase I hypersensitive site*), estos sitios son regiones libres de nucleosomas donde suelen estar localizados elementos regulatorios como promotores y *enhancers*, y se sabe que los TSS suelen ser regiones desprovistas de nucleosomas (Li et al., 2007).

Este análisis nos permitió determinar que existe un enriquecimiento para la H3K4me3, H3K9ac así como de nucleosomas que contienen a la variante de histona H2A.Z tanto río arriba como río abajo del ATG (Figura 14). Además, justo entre los picos de estas marcas se localiza un sitio de hipersensibilidad a DNAasa de aproximadamente 370 pb (Figura 14). Por lo que tomando en cuenta las marcas epigenéticas, la presencia de nucleosomas que contienen a H2A.Z y el DHS, este análisis nos indicaba que el probable TSS podría localizarse a 438 pb con respecto al ATG (Figura 14).

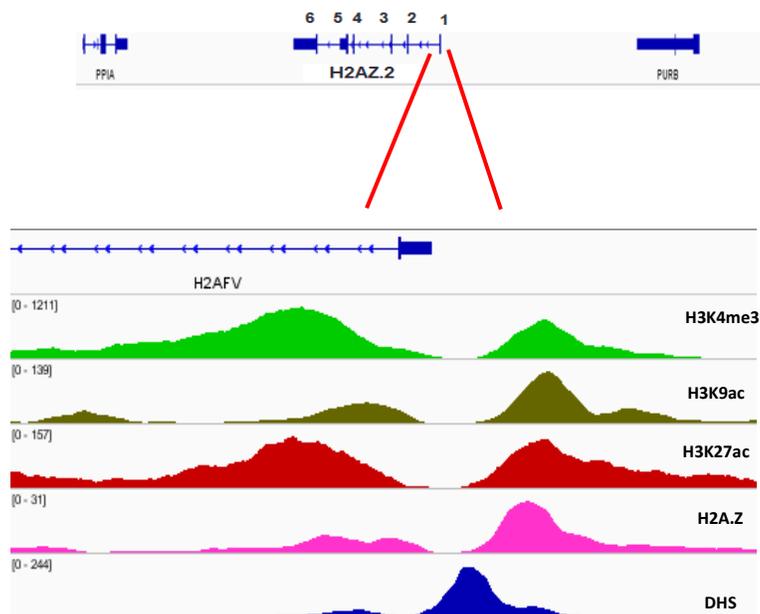


Figura 14 Análisis bio informático para la búsqueda de marcas de histonas.

En la parte superior de la figura se muestra un esquema del gen H2A.Z.2 el cual está constituido por 6 exones (cada uno de los exones aparece enumerado), las flechas que están en sentido a la izquierda en el mismo esquema del gen indican que la transcripción del gen se realiza en la cadena antisentido. La línea negra inferior a este esquema indica la región *upstream* del gen H2A.Z.2 en la que se buscó las marcas epigenéticas, la histona H2A.Z y los DHS. En el esquema se muestra que existe un enriquecimiento tanto río arriba como río abajo del primer exón del gen H2A.Z.2 de las marcas epigenéticas H3K4me3 (verde), H3K9ac (café), H3K27ac (rojo) nucleosomas que contienen a la variante H2A.Z (rosa). El sitio de hipersensibilidad a DNAasa está localizado entre los picos de las señales anteriores (azul).

6.2 El probable TSS está localizado en la región comprendida entre 309 y 289 pb río arriba del ATG

Considerando que el sitio “+1” o el TSS es la primera base incorporada en el ARN mensajero y con el propósito de identificar este sitio para el gen H2A. Z.2, con mayor precisión que el abordaje bioinformático decidimos emplear dos estrategias experimentales. En la primera estrategia, se realizó una RT-PCR en la que se empleó como templado ADN complementario y oligonucleótidos sentido diseñados en dirección 5´ del gen. En la segunda estrategia se realizó la técnica de RACE 5´.

Para realizar la RT-PCR inicialmente se extrajo el ARN total de la línea celular PANC-1 utilizando el reactivo TRIzol. Una vez que se purificó el RNA se le dio un tratamiento con ADNasa I para eliminar las trazas de ADN. Tras corroborar mediante una PCR que efectivamente se eliminó el ADN de la muestra de ARN, se verificó la integridad del ARN tratado. Para lo cual el ARN se migró en un gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes. La integridad de la muestra de ARN se pudo confirmar al observar la presencia de dos bandas bien definidas que corresponden a los ARN ribosomales 28S y 18S (Figura 15).

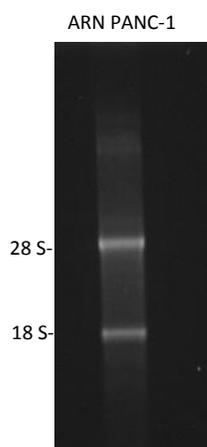


Figura 15 Integridad del ARN de la línea celular PANC-1

El ARN proveniente de la línea celular PANC-1 se migró en un gel de agarosa al 1.2% con tiocianato de guanidina, al término de la electroforesis el gel se tiñó con una solución de BrEt para poder visualizar las bandas de ARN correspondientes a los ARN ribosomales 28S y 18S.

Una vez que se verificó la integridad del ARN tratado con ADNasa I, éste se usó como templado para la síntesis del ADN complementario para lo cual se empleó oligo(dT) y la enzima retro transcriptasa reversa. Este ADNc por provenir del ARNm únicamente contiene la región codificante, la región 5'UTR, y carece de las secuencias que están situadas río arriba del TSS, es decir el promotor. Por lo que el empleo de este ADNc nos permitiría identificar una región donde posiblemente se ubica la base "+1" o el TSS. Para esta PCR se utilizaron cinco oligonucleótidos sentido diseñados a lo largo del extremo 5' del gen H2A.Z.2 a partir de la posición -205 y hasta la posición -510 relativas al ATG (Figura 16 y 17A). Para todas las reacciones se utilizó el mismo oligonucleótido anti sentido localizado a una distancia de 93 pb río arriba del ATG, tal como se muestra en la Figura 16 y 17A.

-438 pb TAGCTAATTT TGCTGTCCTT CCCAGTGGCC CGCCTCCCTT GCTCGCGGGC GATATTTTTA TTGGCTTTCG TCTGCGAGGC
 -358 pb GTCCAATCTC ATTGGTTTGC CTTTCTGTTC GTCAGGCTTG GCGCCTGGT GAAAGGCAGA GAGCGCGTCA CTATTGGGGC
 -278 pb TGGAGGCCCC GCCTCCGCGT GCCGTGTGCA AAAACAAACA GCCGTTAGGA AGGCGGTGCC GGGGGGGCGG GGTCTGGCTA
 -198 pb GAAGGAGGCG CGCGATTGAA CAGCCGCTGG GGTTGCAACC AGCAAGACAA GCGGGCATTG GCCACAGCAG CGCGAGGCGG
 -118 pb GCACGGGGTA TTGTCCGCT CCGCGGGCGG CGGTCGGTGC TGCAGAGCG GCGGCGGCGG CGCGGGTCGG CAGCGGGAGG
 -38 pb GCGCGCGGCC GAGCGGAGGC GGAGTCGGCG CCGAGAACATG

Figura 16 Secuencia correspondiente a los 438 pb en donde probablemente este localizado el TSS

En este esquema se muestra la secuencia correspondiente a los 438 pb obtenida por el análisis bioinformático. El codón de inicio de la traducción del gen H2A.Z.2 esta resaltado en letras rojas. La posición de los nucleótidos en esta secuencia está indicada con respecto al ATG. Las flechas rojas indican las posiciones de los oligonucleótidos diseñados para la PCR para mapear el TSS.

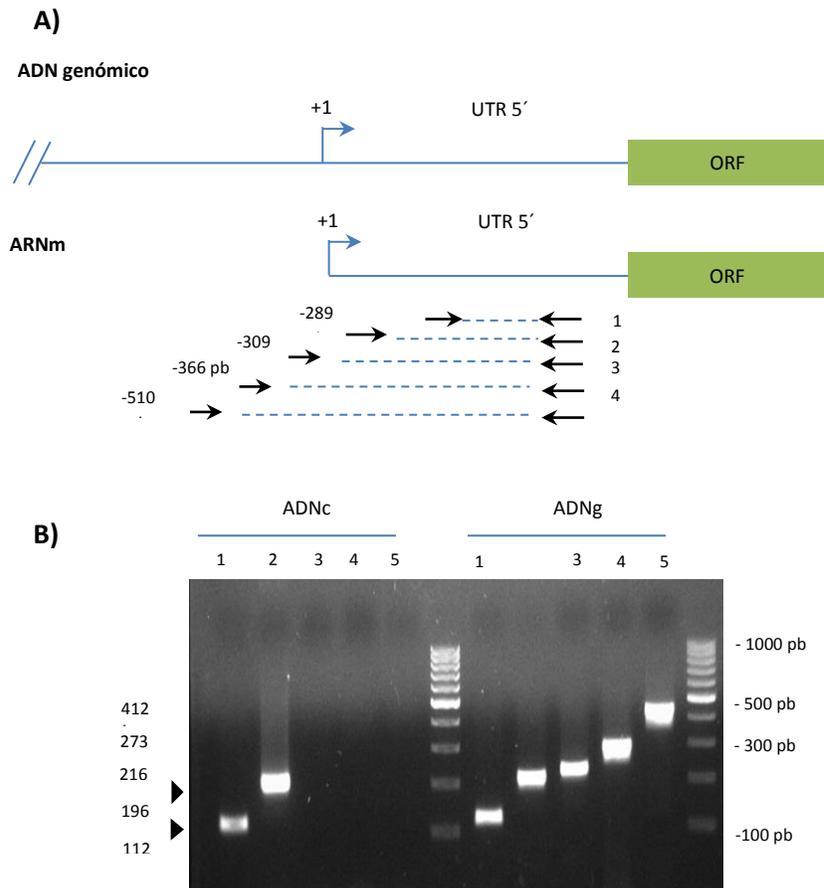


Figura 17 Estrategia utilizada para el mapeo de la región 5'UTR del gen H2A.Z.2.

- A)** Localización de los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de PCR. **B)** Reacciones realizadas utilizando como templado el ADNc (parte izquierda del gel), o utilizando como templado el ADN genómico (parte derecha del gel).

El resultado de esta PCR se muestra en la Figura 17-B donde únicamente observamos los amplicones del tamaño esperado para los oligonucleótidos que están localizados a 205 y 289 pb río arriba del ATG (carril 1 y 2 parte izquierda del gel). Mientras que, con el oligonucleótido situado a 309 pb río arriba del ATG ya no se obtuvo producto amplificado (Figura 17-B). Para corroborar que la falta de amplificación de los oligos localizados en las posiciones -309, -360 y -510 no se debía a que los oligos no funcionaran, sino más bien a la falta de templado en el extremo 5' del ADNc, se realizaron otras reacciones de PCR empleando los mismos oligos pero utilizando como templado el ADN genómico. Como se observa en la Figura 17-B (parte derecha del gel) se obtuvo el producto del tamaño esperado en todas las reacciones de PCR. Por lo que entonces estos resultados indican que el probable TSS podría estar localizado en la región comprendida entre 309 y 289 pb río arriba del ATG.

Con el objetivo de determinar con exactitud qué base corresponde al sitio +1, utilizamos la técnica de RACE 5' (Amplificación rápida del extremo 5' cDNA). Esta técnica es ideal ya que permite caracterizar las secuencias no conocidas de los extremos 5' de los ARNm. Como primer paso para realizar el RACE 5', a partir del ARNm que se extrajo de la línea celular PANC-1 se sintetizó ADNc para lo cual se utilizó un oligonucleótido anti sentido específico para el ARNm de H2A.Z.2 "Rvs-Hind-2" localizado a una distancia de 93 pb río arriba del ATG (Figura 18). De esta forma únicamente se sintetizó el ADNc del ARNm de H2A.Z.2.

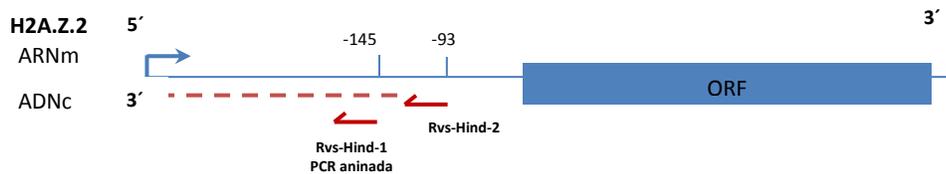


Figura 18 Localización del oligo gen específico empleado para la síntesis del ADNc.

Para conocer la secuencia del extremo 3' del ADNc de H2A.Z.2 en el cual se encuentra el sitio "+1", era necesario amplificarlo y posteriormente mandarlo a secuenciar. Sin embargo, ya que no conocíamos la secuencia en el extremo 3' del ADNc entonces el siguiente paso del RACE 5' consistió en la adición de un tracto homopolimérico de citosinas al extremo 3' del ADNc (Figura 19). Este tracto de citosinas funciona como una secuencia de anclaje conocida y complementaria a un oligonucleótido sentido permitiendo de este modo amplificar el ADNc. La adición de las citosinas en el extremo 3' del ADNc se realizó utilizando la enzima deoxinucleótidil transferasa terminal (TdT) en presencia de dCTPs (Figura 19).

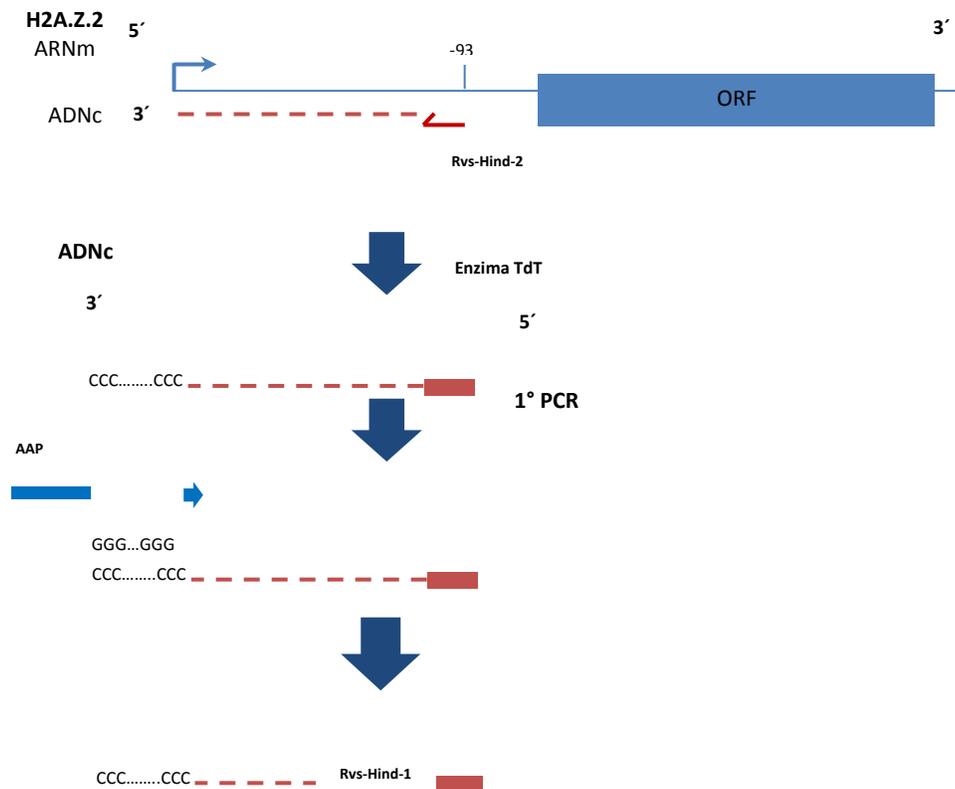


Figura 19 Esquema de la técnica RACE 5'

Para la adición del adaptador de citosinas se utilizó la enzima TdT (deoxinucleótidil transferasa terminal). En la primera PCR del ADNc *tailed* se utilizó el oligo "Rvs-Hind-2" y en la segunda PCR un oligo anidado "Rvs-Hind-1"

Una vez que se obtuvo el ADNc, el cual contiene ahora un tracto de citosinas en su extremo 3' (ADNc-*tailed*) se realizó una primera PCR en la que se utilizó el mismo oligonucleótido anti sentido que se empleó para la síntesis del ADNc y el oligonucleótido sentido AAP (Abridged anchor primer) que es complementario al tracto de citosinas (Figura 19). El producto de esta PCR fue analizado en una electroforesis en gel de agarosa. Sin embargo al exponer el gel a la luz UV no se observó ninguna banda probablemente a que había un bajo número de copias. Por lo que debido a que no obtuvimos una buena cantidad de amplificado y para dar mayor especificidad al ensayo, el

producto de esta PCR se empleó como templado para una segunda PCR en la que se utilizó un oligonucleótido “Rvs-Hind-1” ubicado a 49 pb río arriba del oligo “Rvs-Hind-2” (PCR anidada) (Figura 19).

El amplicón obtenido de esta segunda PCR se migró en un gel de agarosa en el que se observa un producto de aproximadamente 200 pb (Figura 20A). Con la finalidad de recuperar una buena cantidad de este amplicón se realizaron cuatro reacciones de este PCR anidada, todas las bandas de ADN en el gel correspondientes a este fragmento fueron cortadas, purificadas y el fragmento purificado se secuenció. El resultado de la secuenciación indica que el sitio “+1” ó el TSS corresponde a una guanina (G) ubicada a 292 pb río arriba del ATG (ver Figura 20B).

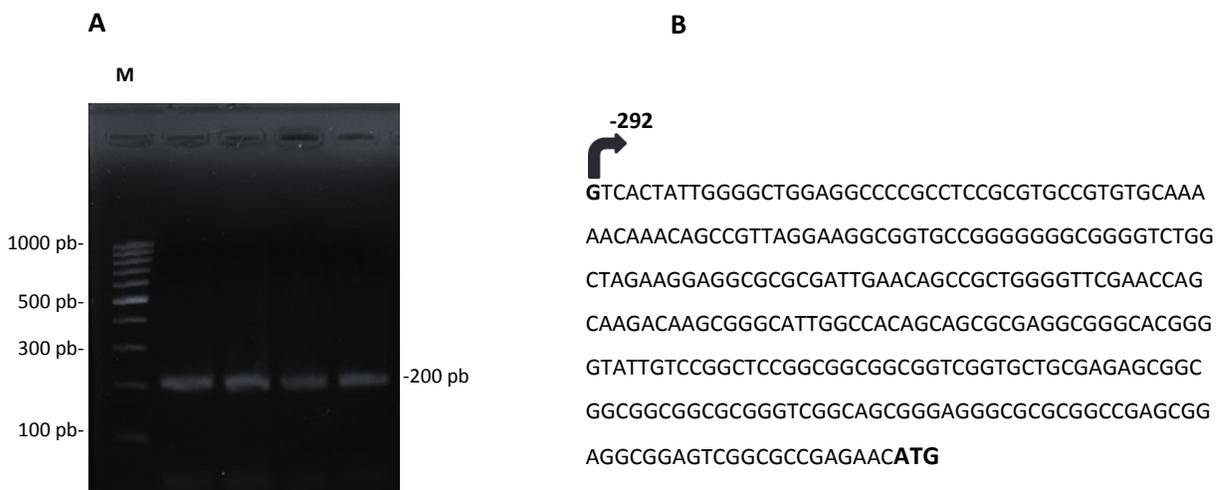


Figura 20 El sitio de inicio de la transcripción se ubica a 292 pb río arriba del ATG

- A)** En esta PCR se utilizó el oligonucleótido antisentido anidado y el oligo AUP. Se realizaron cuatro reacciones ya que cada una de estas bandas se recuperó del gel de agarosa para después purificarlo y clonarlo. **B)** La secuenciación de este amplicón indicó que el sitio de inicio de la transcripción indicado con una flecha está localizado a 292 pb río arriba del ATG.

6. 3 Amplificación de 1421 pb de la región *upstream* del gen H2A.Z.2

Una vez determinado el sitio de inicio de la transcripción y para evaluar si la región localizada río arriba del TSS era capaz de conducir la expresión del gen H2A.Z.2, es decir si esta región corresponde al promotor, se

realizó un ensayo de gen reportero de luciferasa en la línea celular PANC-1, para lo cual inicialmente se amplificaron 1421 pb de la región *upstream* de este gen.

Para el diseño de los oligonucleótidos empleados en la amplificación del promotor de H2A.Z.2 se consideró los resultados reportados por Dryhurst (2009), quienes al realizar un análisis *in silico* de la región *upstream* del gen H2A.Z.2, encontraron que esta región carecía de una caja TATA. Por lo que si tomamos en cuenta que los promotores “TATA less” suelen tener elementos en *cis* ubicados río abajo del TSS que ayudan al ensamblaje del complejo de pre-inicio de la transcripción (PIC) (Juven-Gershon & Kadonaga, 2010), decidimos amplificar un fragmento de 1421 pb (al cual denominamos F-1500). Para lo cual diseñamos un oligonucleótido sentido “Fwd-1500” situado a una distancia de 1221 pb río arriba del TSS y el oligonucleótido anti sentido “Rvs-Hind-2” ubicado a 200 pb río abajo con respecto al sitio de inicio de la transcripción, en donde pudiéramos identificar elementos en *cis* que en ausencia de la caja TATA ayuden al ensamble del PIC (Juven-Gershon & Kadonaga, 2010).

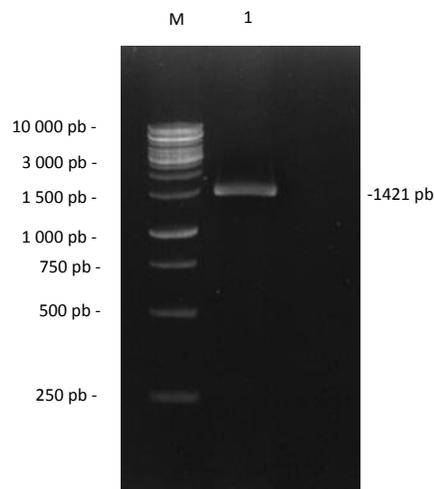


Figura 21 Fragmento de 1421 pb de la región *upstream* del gen H2A.Z.2.

El F-1500 se amplificó empleando un oligo “Fwd-1500” situado a 1421 pb río arriba del TSS y un oligo “Rvs-Hind-2” ubicado a 200 pb río abajo del TSS. El amplicón obtenido se analizó en un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio. M, marcador de 1Kb

Como se observan en la figura 21 el producto de la PCR fue del tamaño esperado (1421 pb), el cual fue cortado del gel de agarosa para posteriormente clonarlo en el vector pJET 1.2/*blunt*. De esta forma obtuvimos la construcción “pJET 1.2-1500”, la cual se transformó en las células *E.coli* de la cepa XL-10 Gold.

Para identificar las colonias que contenían el vector con el inserto de interés se realizó una PCR de colonia. En esta PCR se utilizó el oligonucleótido anti sentido “Rvs- pJET-1.2”, que es específico del vector y que se localiza a 33 pb río abajo del sitio de múltiple clonación (Figura 22A) y un oligonucleótido sentido “Fwd-500” que es complementario a una secuencia interna del inserto ubicado en la posición -218 a -197 relativo al TSS. De tal forma que se esperaba obtener un producto de 457 pb (Figura 22B). Como se aprecia en la Figura 22B de las cuatro colonias analizadas fueron todas positivas.

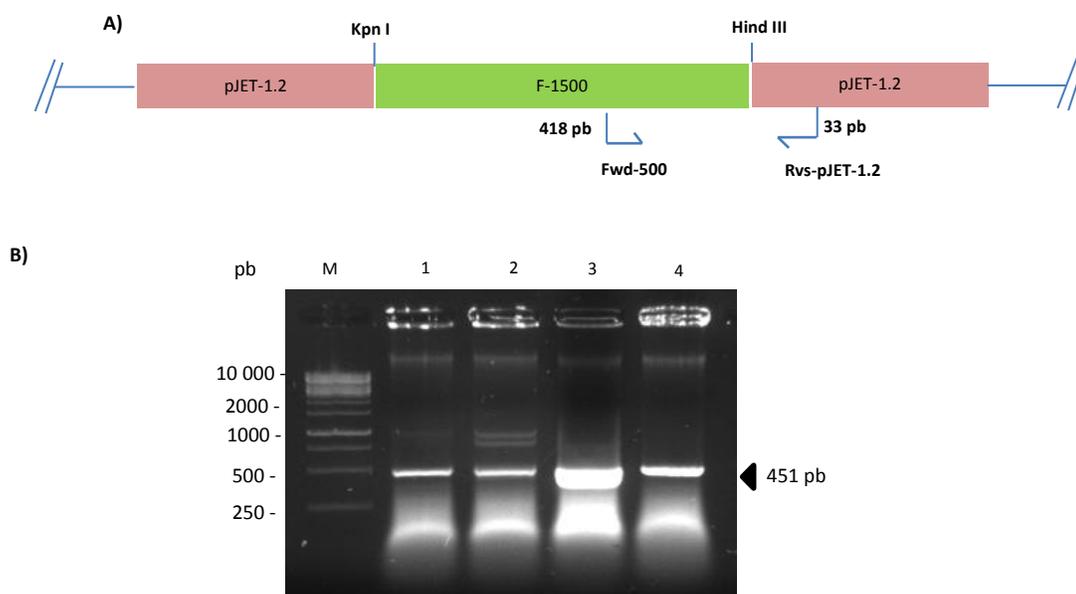


Figura 22 Identificación de las colonias recombinantes mediante PCR de colonia.

A) Para esta PCR se utilizó el oligonucleótido anti sentido específico del vector que está localizado a 30 pb río abajo del sitio de múltiple clonación (MCS) y un oligonucleótido sentido específico (Fwd-500) del inserto que está localizado en la posición 418 del F-1500 **B)** Todas las colonias analizadas resultaron positivas

A fin de obtener el ADN plasmídico de la construcción pJET 1.2-1500, una de estas colonias (número 3) se inoculó en un medio líquido LB-ampicilina y para corroborar la presencia del inserto “F-1500” se realizó una doble digestión del plásmido pJET 1.2-1500 empleando las enzimas de restricción Kpn I y Hind III. La reacción de digestión se analizó en un gel de agarosa al 1% y una vez que se corroboró que el inserto liberado tuvo el tamaño esperado (1421 pb) (Figura 23), la banda de ADN correspondiente al F-1500 fue cortada del gel y purificada para posteriormente sub clonarla en el vector pGL3-Basic.

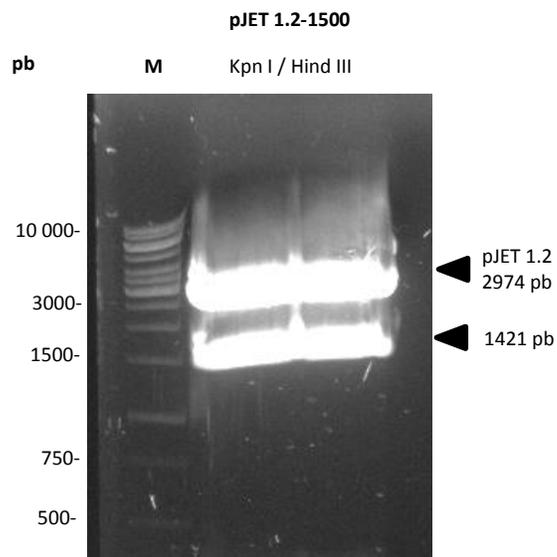


Figura 23 Digestión del plásmido pJET 1.2 -1500

Para verificar la presencia del inserto se realizó la digestión de la construcción con las enzimas Kpn I y Hind III, en el gel se observa la liberación del producto del tamaño esperado. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. M, marcador de 1Kb

6.4 Obtención de la construcción pGL3-1500

Con el objetivo de evaluar si esta región de 1421 pb es capaz de activar la transcripción, el inserto “F-1500” se subclonó en el vector pGL3-Basic. Este vector contiene el gen reportero de la luciferasa y carece de un promotor (ubicado río arriba del gen reportero), así como de otros elementos regulatorios como *enhancers*. De tal manera, que el gen de la luciferasa sólo se expresará si en el sitio de múltiple clonación (que está ubicado río arriba del gen reportero), es clonado un promotor capaz de dirigir la expresión del gen reportero.

Una vez que se ligó el fragmento F-1500 al vector pGL3-Basic, bacterias *E.coli* de la cepa XL-10 Gold fueron transformadas con la construcción a la que se le dio el nombre de pGL3-1500. Posteriormente las colonias recombinantes que contenían la construcción de interés fueron identificadas mediante PCR de colonia. Para lo cual, se picaron 6 colonias y se utilizó un oligonucleótido anti sentido específico del vector (GLprimer2) localizado a una distancia de 53 pb río abajo del sitio de restricción de Hind III y el mismo oligonucleótido sentido (Fwd-500) empleado en la PCR de colonia anterior (Figura 24-A). De tal forma que esperábamos obtener un producto de aproximadamente 471 pb. Como se aprecia en la Figura 24-B, todos los productos de PCR que se migraron en el gel de agarosa tuvieron el tamaño esperado por lo tanto las 6 colonias analizadas fueron positivas.

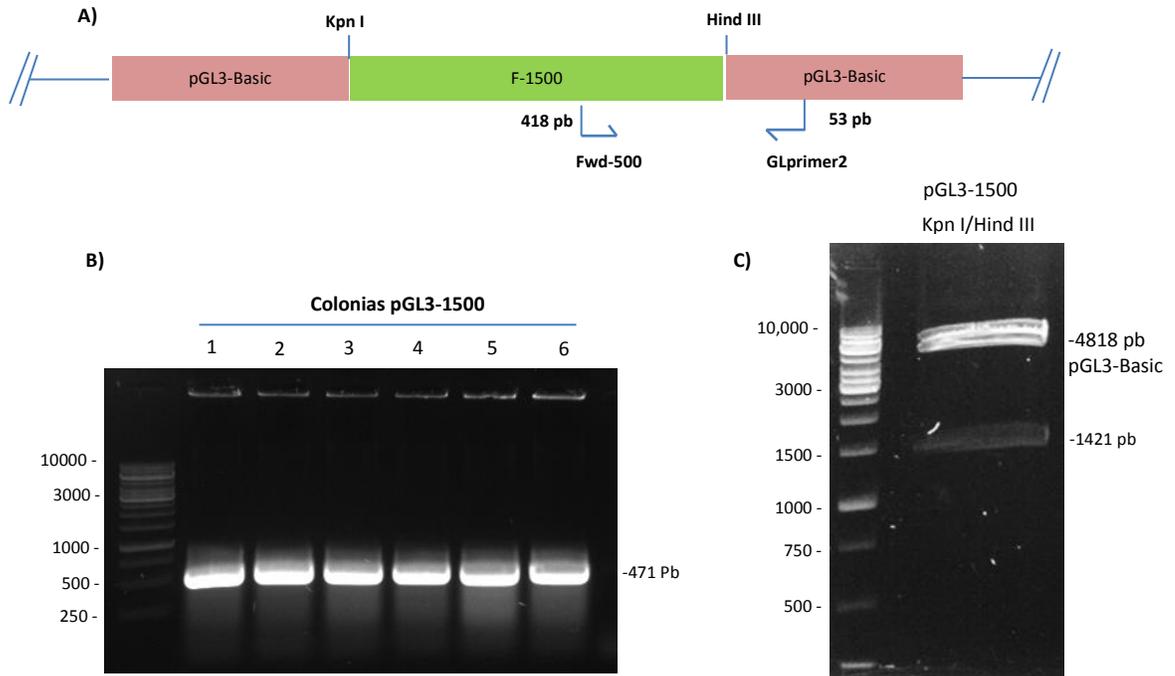


Figura 24 Generación de la construcción pGL3-1500

A) Localización de los oligonucleótidos utilizados en la PCR de colonia. **B)** Se analizaron 6 colonias de las cuales todas resultaron positivas, para la esta PCR se utilizó un oligo específico del vector localizado a 53 pb río abajo del sitio de múltiple clonación y el oligo Fwd-500 . **C)** Digestión del plásmido pGL3-1500 con las enzimas Kpn I y Hind III.

De estas colonias elegimos a 2 de ellas para aislar el ADN plasmídico, el cual se digirió con las enzimas Kpn I y Hind III. El producto de la digestión se migró en un gel de agarosa en el que se observó la liberación del producto del tamaño esperado (Figura 24-C).

6.5 Secuenciación de la construcción pGL3-basic

Una vez que generamos la construcción de interés (pGL3-1500), y debido a que era muy importante saber si durante la amplificación de este fragmento, no se hubiera introducidos cambios que pudieran alterar los motivos de unión a los factores de transcripción ésta se secuenció. La secuenciación reveló que la construcción, pGL3-1500 presento un 100% de identidad

con la secuencia reportada en Pubmed (Número de referencia NC_000007.14), para el gen H2A.Z.2 (Anexo 1).

6.6 La región de 1421 pb es capaz de activar la transcripción

Una vez que se corroboró que el inserto clonado en el vector pGL3-Basic efectivamente correspondía a parte de la región *upstream* del gen H2A.Z.2 se realizó el ensayo de luciferasa.

Para realizar este ensayo, inicialmente se transfectó la construcción pGL3-1500 a las células PANC-1, este plásmido fue cotransfectado con el vector pRL-SV40. Este último, contiene el gen reportero de la luciferasa de la *Renilla reniformis* y se utilizó como control interno para normalizar los datos obtenidos. Adicionalmente otro pozo de células fue transfectado con el pGL3-Basic vacío el cual fue utilizado como control negativo, y para estar seguros de que estábamos realizando el experimento de manera correcta como control positivo se utilizó el pGL3-Promoter en el cual la expresión de la luciferasa es conducida por el promotor del SV40. En ambos casos se cotransfectó con el vector pRL-SV40. Transcurridas 48 horas después de la transfección, se realizó el ensayo de luciferasa.

En este ensayo se encontró que la actividad de luciferasa de la construcción pGL3-B-1500 presentó casi 80 veces mayor actividad comparada con el vector vacío (Figura 25) lo que indica que la región *upstream* (F-1500) del gen H2A.Z.2 es capaz de activar la transcripción. Además la actividad de luciferasa del pGL3-1500 fue similar a la obtenida con el pGL3-Promoter (Figura 25), indicando que la región *upstream* del gen H2A.Z.2 activa la transcripción con una fuerza similar al promotor del SV-40, el cual es considerado como un promotor de fuerza intermedia. Por lo tanto, este resultado sugiere que el fragmento de 1421 pb funciona como un promotor capaz de conducir la expresión del gen reportero de la luciferasa.

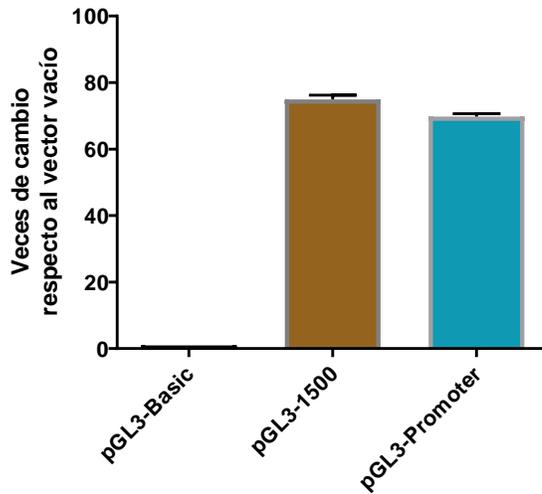


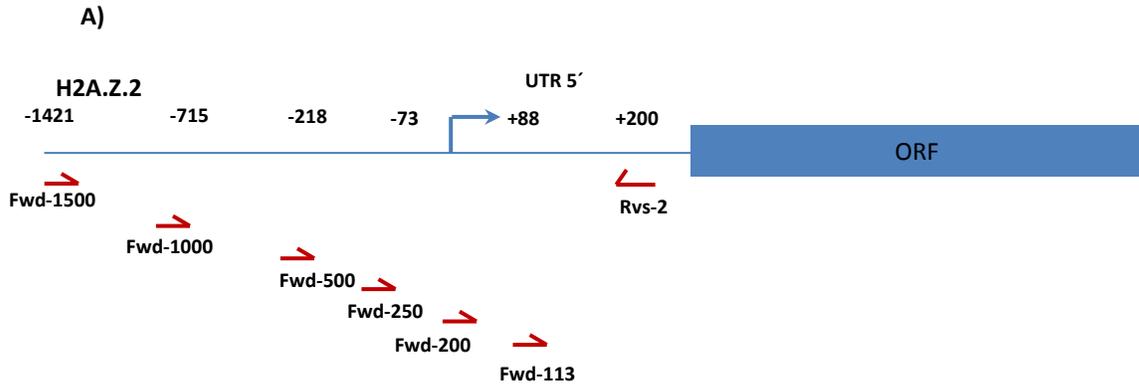
Figura 25 El fragmento de 1421 pb de la región upstream del gen H2A.Z.2 es capaz de conducir la expresión del gen de la luciferasa

6.7 Caracterización funcional del promotor del gen H2A.Z.2 mediante un análisis de deleciones

Se sabe que los promotores de los genes que son transcritos por la ARN polimerasa II (ARNpol II) tienen una estructura bipartita formada por un promotor mínimo que típicamente abarca de la posición -50 a +50 respecto al TSS y elementos regulatorios *upstream*, los cuales están formados por motivos en *cis* a los cuales se pueden unir factores de transcripción (FTs) que pueden activar y/o reprimir la transcripción (Juven-Gershon & Kadonaga, 2010). Para tratar de identificar donde se localiza el promotor mínimo así como los elementos regulatorios *upstream*, y de esta forma realizar una caracterización funcional de los elementos en *cis* que controlan la expresión del gen H2A.Z.2. se generaron varias construcciones en el vector pGL3-Basic con fragmentos del promotor 500 pb más cortos en su extremo 5' de tal forma que por PCR se obtuvieron fragmentos de 918, 415, 273, 196 y 113 pb a los que se les dio el nombre de F-1000, F-500, F-250, F-200 y F-113 respectivamente.

6.8 GENERACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES PGL3-1000/500/250/200 Y 113

Al igual que con la construcción pGL3-1500 el primer paso para generar estas construcciones fue realizar una PCR para amplificar cada uno de estos fragmentos. Para su amplificación se empleó como templado el ADN plasmídico de la construcción pGL3-1500, el mismo oligonucleótido anti sentido (Rvs-Hind-2) empleado para amplificar el fragmento F-1500 y oligonucleótidos sentido localizados en las posiciones -715, -218, -73, +1 y +88 con respecto al TSS (Figura 26 A-B).



B)

```

-1221 CTGGGAGTTA TCCTCCAAAAT TTTAACCTAA TGATGTAA GCAAAATAAA CACTGAAG AGGTTGAGAA AAGAAAAACG
      Fwd-1500
GCTCACAACA GTCTGAGCTC TGTGAGGTCT GCAAAATGTA TTAGGCCTAG AGGGACATGA GTATGGGACT TCGTTATGTC
CCACCCTCTG CCCCCACATA CACACATACC CAATCCCATG CATACCCAAT TGTTTAAAGT CATTTCATTC CTGACTATCG
-1041 GCCTCATCCA TTACCTTTTT TTTTATTATT ATTTTTTAGA CAGGGTATAT TCTGTCTCCC AAGCTGGAGT GCAGTGGTGC
GATCATGACT CACTGCAGCC TCGACCTCT GGGCTCAAGA GATCCTCCTG TCTCAGTCTT GACAGTAGGT GAGGCTACAG
-881 GTTCGCGCCA CCAAGCCGGC CCCATTATCT TCGTGTCTT AGAATTTGTA ATACATGCCG GGCGCGGTGG CTCACGCTCG
      Fwd-1000
TAATCCCAGT ACTTTGGGAG GCAAAGGGGG GCAGATCACC TGAGGTCAGG AGTTCGAGAC CAGCCTGACC AACACGGAGA
-721 AACCCCGTCT CTATTAATAA TACAAAAGTT AGCTGGGCAT TGGGGCGCGC GCCTGTAGTC CCAGGACTCC ATCTCTAAAA
AAGGAAAAAG AATTTGTCAT ACAATAACA ATATGTAGCC AATTGATAGC TTTTGTTTTT GTTTGTTTGT TTTGAGACGA
-561 TGCGTCGCCC AGCTGGAGTG CAGTGGCGCG ATCTCGGCTC ACTGCAACCT CCGCCTCCGG GGTTC AAGCG ATTCTCCCGC
CTCAGCCTGC CGCGGACCTT GTCAGGGTCC GCGCTGAGAG GACGTCAGGG TAGTCAGTCC GCCAGAATAC GGCTGAGCAT
-401 GAGGCTGACC TAACCTTGAA ACCCAGCGCC CTCTGATCC ACACGTTCTA AGACGAATAA ATCCTCACAG TCTGTGAAAA
CCCACCAGGA GAAGCACGTC CAACACTCTT TACCTCCCCA AACACAGTC TGTGAAAACC CACCAGGAGA AGCACGTCCA
-241 ACACTTTTAC CTCCCCAAC AAGTCTCAGA AGCGGGAAA ACCAACGCCG CGAATGGGCG GAAAGCCAC AGCGCCTGCA
      -218 Fwd-500
ATCGCTTAC CTTATTAGCT AATTTTGTG TCCTTCCAG TGGCCCGCT CCCTTGCTCG CGGGCGATAT TTTTATTGGC
-81 TTTGCTGTC GAGGCGTCCA ATCTATTGG TTTGCCTTTC TGTTCTGTCAG GCTTGGGCGC CTGGTAAAAG GCAGAGAGCG
      +1 -73 Fwd-250
CGTCACTATT GGGGCTGGAG GCCCCGCTC CGCGTGCCGT GTGCAAAAAC AAACAGCCGT TAGGAAGGCG GTGCCGGGGG
      Fwd-200
+82 GGCGGGTCT GGCTAGAAGG AGGCGCGCGA TTGAACAGCC GCTGGGGTTC GAACCAGCAA GACAAGCGGG CATTGGCCAC
      +88 Fwd-113
AGCAGCGCGA GGCGGGCACG GGTA TTGTCCGGCT CCGCGCGCGG CGGTGCGTGC TGCGAGAGCG GCGCGGGCGG
      Rvs-Hind-2 +200
CGCGGGTCCG CAGCGGGAGG GCGCG CGGCCGAGCG GAGGCGGAGT CGGCGCCGAG AACATG

```

Figura 26 A-B Localización de los oligos empleados para amplificar cada uno de los fragmentos del promotor de H2A.Z.2

Las reacciones de PCRs se migraron en un gel de agarosa y tras corroborar que los amplicones obtenidos eran del tamaño esperado (Figura 27), las bandas de ADN del gel se cortaron y se purificaron para clonarlas.

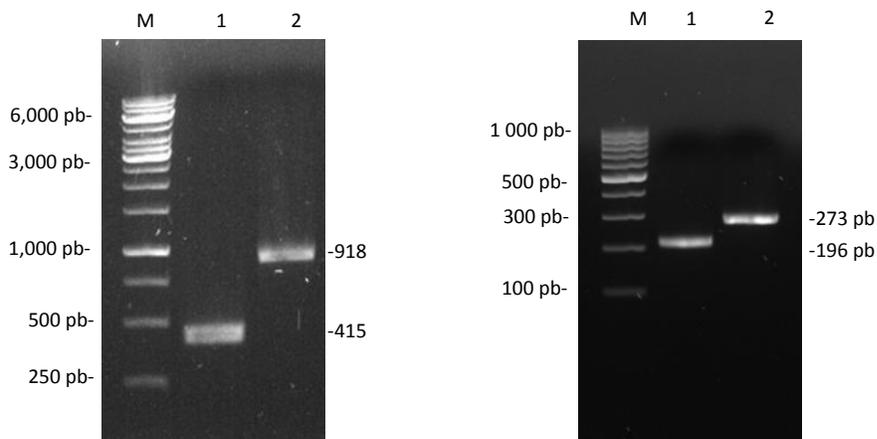


Figura 27 Fragmentos amplificados de 918, 415, 273, 196 y 113 pb.

A) Gel de agarosa al 1.2% teñido con BrEt en donde se observa los amplicones de 415 y 918 pb, carriles 1 y 2 respectivamente., M: marcador de 1Kb. **B)** Amplicones de 273, 196 carriles 1 y 2 respectivamente se migraron en un gel de agarosa al 2%, M: marcador de 100 pb.

Los fragmentos F-1000 y F-500 inicialmente se clonaron utilizando un vector intermedio y posteriormente se subclonaron en el vector pGL3-Basic. Mientras que para los insertos F-250, F-200 y F-113 fueron ligados directamente en el vector pGL3-Basic. En la figura 28 se muestra los plásmidos obtenidos para las construcciones pGL3-1000/500/250/200 y 113 en donde además después de la digestión de estos plásmidos con las enzimas Kpn I y Hind III cada uno de ellos liberó el inserto del tamaño esperado.

Finalmente se secuenció cada una de las construcciones generadas, con el propósito de comprobar que cada uno de los insertos clonados se trataba del promotor del gen H2A.Z.2 y que durante el proceso de amplificación y/o clonación no se hubieran producido cambios en la

secuencia nucleotídica que pudieran alterar los resultados en los ensayos de gen reportero (Anexo 2).

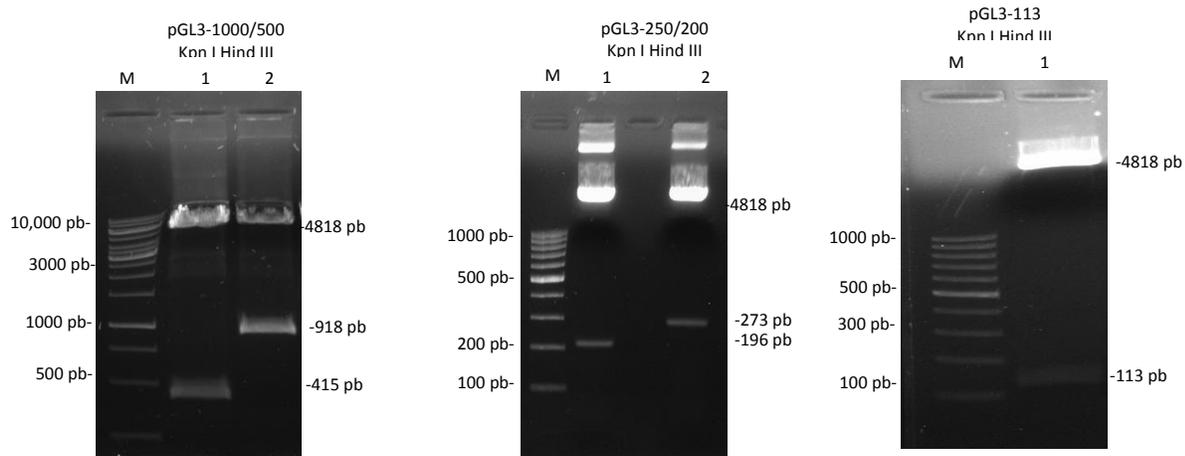


Figura 28 Digestión de las construcciones pGL3-1000/500/250/200/113 con las enzimas de restricción Kpn I Hind III

A) Gel de agarosa al 1% M, marcador de 1Kb. Carril 1, plásmido pGL3-500. Carril 2, pGL3-1000. **B)** Gel de agarosa al 2% M, marcador de 100 pb. Carril 1 pGL3-200. Carril 2 pGL3-250. **C)** Gel de agarosa al 2% M, marcador de 100 pb. Carril 1 pGL3-113.

El alineamiento de cada una de estas secuencias con la secuencia reportada de la región 5' del gen H2A.Z.2 mostró que no hubo cambios durante la amplificación del inserto (Anexo 2). Con lo cual se pudo corroborar que las secuencias clonadas son idénticas a la reportada en Pubmed.

6.9 La región ubicada entre 715 y 218 pb río arriba del TSS contiene elementos en *cis* activadores de la transcripción

Hecho lo anterior se procedió a realizar los ensayos de gen reportero con todas las construcciones generadas. Para lo cual, 5×10^4 células de la línea celular PANC-1 fueron sembradas en una placa de 24 pozos. Las células se dejaron crecer por 24 horas para permitir que alcanzaran una confluencia del 70%. En este punto las células fueron transfectadas transitoriamente con cada una de las construcciones utilizando el reactivo "TURBOFECT". En todos los casos estas construcciones fueron co-transfectadas con el vector pRL-

SV40. Los datos obtenidos indican que la actividad de luciferasa del pGL3-1000 fue similar a la de pGL3-1500, mientras que la actividad de luciferasa obtenida con la construcción pGL3-500 disminuyó casi en un 50% con respecto a las construcciones pGL3-1500 y pGL3-1000 (Figura 29). Este último resultado sugiere que en la región localizada entre los nucleótidos -715 y -219 hay elementos en *cis* que regulan positivamente la transcripción del gen H2A.Z.2. Esto porque al eliminar esta región del promotor disminuye la actividad transcripcional significativamente. Sorprendentemente con la construcción pGL3-250 la actividad de luciferasa vuelve a incrementarse significativamente aproximadamente un 25 % más con respecto al pGL3-500 sugiriendo la presencia de elementos en *cis* que pueden funcionar como represores de la transcripción en la región ubicada entre los nucleótidos -218 a -74 (posiciones con respecto al TSS) (Figura 29). Por último la construcción pGL3-113 retuvo un 14% de la actividad de luciferasa sugiriendo que en esta región de 113 pb localizada entre las posiciones +88 a +200 (relativo al TSS), puede estar contenido el promotor mínimo (Figura 29).

En conclusión estos resultados indican que el promotor de H2A.Z.2 contiene dos elementos regulatorios: uno que está ubicado en la posición -715 a -219 (relativo al TSS) al que probablemente se unan proteínas con una función activadora de la transcripción, y otro elementos regulatorio que abarca de la posición -218 a -74 al que posiblemente se unan proteínas con una función represora. Mientras que el promotor mínimo podría estar localizado río abajo del TSS entre los nucleótidos +88 a +200.

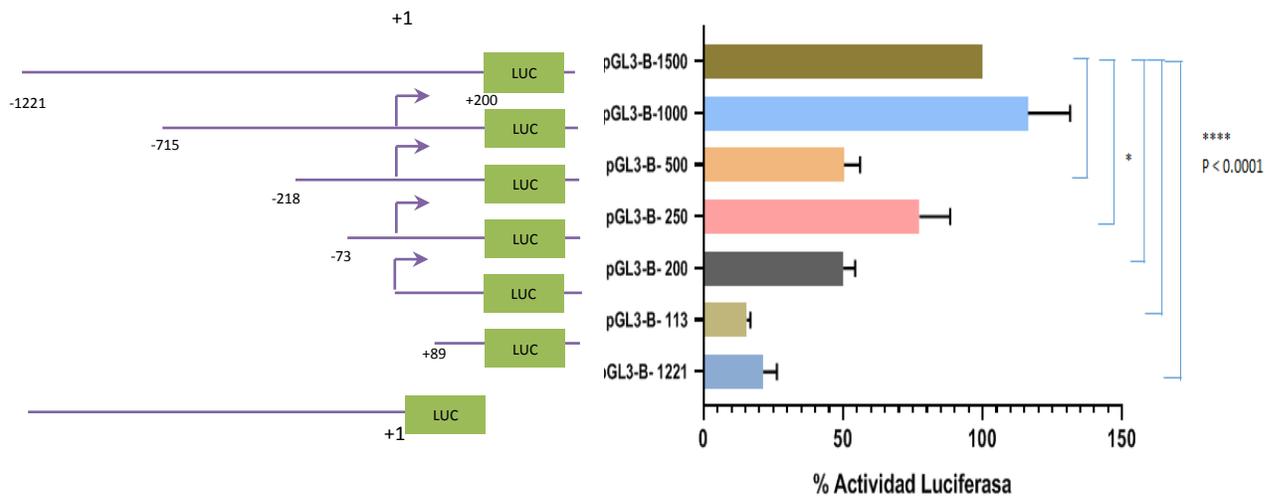


Figura 29 Caracterización funcional del promotor del gen H2A.Z.2.

Las células PANC-1 fueron transfectadas transitoriamente con las construcciones pGL3-1500 (-1221 a +200), pGL3-1000 (-715 a +200), pGL3-500 (-218 a +200), pGL3-250 (-73 a +200), pGL3-113 (+87 a +200) y pGL3-1221 (-1221 a +1). 48 horas después de la transfección se midió la luminiscencia emitida por cada una de las muestras. La actividad de luciferasa fue normalizada con la actividad de luciferasa de la *renilla reniformis* del vector pRLSV40 y expresada como porcentaje de actividad relativa de luciferasa, donde la construcción con el fragmento de mayor tamaño pGL3-1500 tiene el 100% de actividad. Se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba de ANOVA donde se realizó comparaciones múltiples de cada una de las construcciones contra la construcción pGL3-1500.

El promotor mínimo se localiza a una distancia de 89 pb río abajo con respecto al TSS

Para corroborar que en la región de +88 a +113 pb puede estar contenido el promotor mínimo generamos una construcción adicional que únicamente contenía los 1221 pares de bases localizados río arriba del TSS y que carece de la región río abajo del TSS, donde los resultados anteriores sugieren está localizado el promotor mínimo. De tal modo que esperábamos, que aunque esta construcción contiene todos los elementos regulatorios *upstream* del promotor al carecer del promotor mínimo en donde se ensambla el PIC no se expresaría el gen de la luciferasa.

En la Figura 30 se observa que tras la digestión de la construcción pGL3-1221 se liberó el inserto del tamaño esperado. Nuevamente para confirmar que durante la amplificación y/o clonación no se hayan generado cambios en la secuencia clonada en la construcción pGL3-1221 se secuenció (Anexo 3).

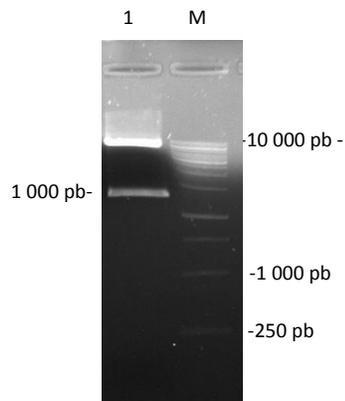


Figura 30 Generación de la construcción pGL3-1221.

La construcción pGL3-1221 se digirió con las enzimas Kpn I y Hind III con lo que se pudo corroborar la presencia del inserto. Gel de agarosa al 1%. M, marcador 1 Kb

Una vez que se corroboró que la secuencia del inserto “F-1221” era correcta, el plásmido pGL3-1221, se utilizó para realizar el ensayo de luciferasa. Inesperadamente encontramos que la construcción pGL3-1221 tuvo una actividad de luciferasa del 20% con respecto al pGL3-1500 (ver Figura 29). Si bien esta construcción es capaz de activar la expresión del gen de la luciferasa, el porcentaje de actividad de luciferasa es bajo si se compara con la construcción pGL3-1500. Por lo que, si tomamos en cuenta que la construcción pGL3-1221 contiene todos los elementos regulatorios *upstream* del promotor presentes en la construcción pGL3-1500, lo cual sugiere que la región localizada río abajo del TSS es necesaria para que el promotor alcance una completa actividad transcripcional.

En conjunto nuestros datos indican que el promotor del gen H2A.Z.2 es un promotor bipartito, constituido por un promotor mínimo que está localizado río abajo del TSS en la posición +88 a +200 (con respecto al TSS) por lo que probablemente sea un promotor “TATA-less” y que existen dos elementos regulatorios *upstream* importantes para la actividad transcripcional: uno localizado en región comprendida entre -715 y -219 pb (relativo al TSS) y conformado por elementos en *cis* a los que posiblemente se unen FTs que activan la transcripción, y otra región situada de la posición -218 a -74 la cual está constituida por elementos en *cis* a los que probablemente se le unan FTs que reprimen la transcripción del gen H2A.Z.2 (ver Figura 31).

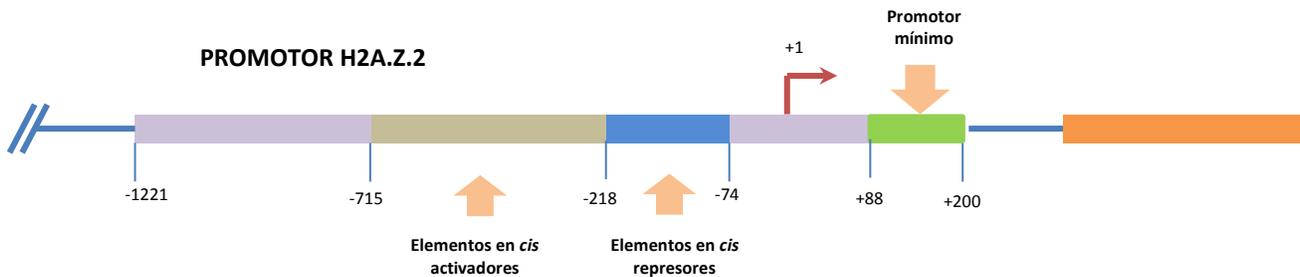


Figura 31 El promotor del gen H2A.Z.2 es un promotor “bipartito”

El promotor está constituido por un promotor mínimo localizado de la posición + 88 a +200 y dos elementos regulatorios *upstream* ubicados entre los nucleótidos -715 a -219 y de -218 a -73 que tienen una posible función activadora y represora en la expresión del gen H2A.Z.2

6.10 El análisis *in silico* para los sitios de unión a factores de transcripción revela múltiples motivos de unión para los factores de transcripción SOX.

Durante el mapeo del promotor del gen H2A.Z.2 nuestros resultados revelaron la posible localización de los elementos regulatorios activadores y represores contenidos en el fragmento de 1421 pb. Con el objetivo de caracterizar aún más esta región y tener una idea de los probables factores de transcripción que se podrían unir y regular la actividad transcripcional del promotor del gen H2A.Z.2, se realizó una búsqueda *in silico* de los posibles motivos de unión para FTs presentes en el promotor. Para esto se utilizaron cuatro bases de datos: PROMO (<http://algggen.lsi.upc.es>), TFBINDINPUT (<http://tfbind.hgc.jp/>) TRANSFACT (<http://genexplain.com/transfac/#section0>), USCS *Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu/>). En el esquema de la Figura 32 se muestran los motivos de unión para aquellos FTs que coincidieron en tres de los cuatro programas lo que aumenta la posibilidad de que estos FTs sean los más probables.

Este análisis reveló que el promotor del gen H2A.Z.2, posee probables sitios de unión para factores de transcripción ubicuos como SP-1, CREB, AP-1, así como para FTs específicos de tejido (en este caso de células ductales pancreáticas ya que el modelo de estudio es la línea celular PANC-1) como PAX-2 y FOXA2. Interesantemente, el análisis *in silico*, reveló que en la región ubicada entre la posición -715 y -219 pb relativo al TSS, contiene sitios de unión para FTs que se sabe pueden funcionar como activadores de la

transcripción. Este dato es congruente con los resultados obtenidos en el ensayo de luciferasa, que sugieren la presencia de elementos en *cis*, en esta región, a los que se estarían uniendo FTs que funcionen como activadores (Ver figura 29).

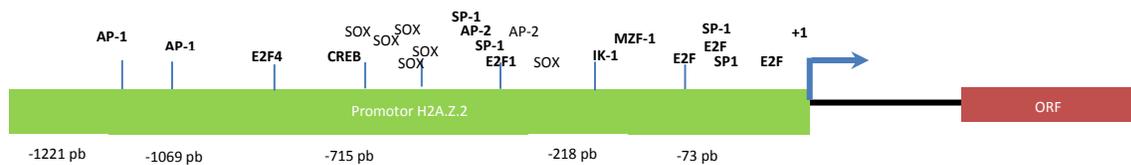


Figura 32 Esquema de los probables sitios de unión para los FTs presentes en el promotor H2A.Z.2

Este análisis se realizó utilizando cuatro bases de datos: PROMO, TFBIND INPUT, TRANSFACT y USCS

Por otro lado el análisis *in silico* mostró que la región de -218 a -73 (posiciones relativas al TSS) contiene sitios de unión para TFs que funcionan como represores de la transcripción como es el caso de MZF-1 y IK-1 (Vishwamitra et al., 2015). Lo anterior también coincide con los resultados obtenidos en los ensayos de luciferasa (ver figura 29) los cuales sugieren la presencia de elementos en *cis* en esta región (-218 a -73 pb relativo al TSS) con una función represora ya que al eliminar esta región la actividad de luciferasa se vuelve a incrementar de manera significativa.

6.11 Generación de construcciones pGL3-SOXmut /SOXwt

Considerando los resultados anteriores que sugieren que en la región comprendida de -715 a -218 (497 pb) relativo al TSS contiene elementos regulatorios que controlan positivamente la transcripción y que son importantes para el nivel de transcripción del gen H2A.Z.2 nos preguntamos ¿qué factor de transcripción se estaría uniendo a estos elementos para activar la transcripción?

Un análisis detallado esta región (-715 a-219) reveló que a lo largo estas 497 pb están distribuidos 6 probables motivos de unión para las proteínas SOX. Se sabe que esta familia de proteínas funcionan como activadores transcripcionales y que se han identificado alrededor de 20 en humano, siendo una de estas proteínas específica de páncreas (SOX9) (She & Yang, 2015). Además, se ha reportado por varios grupos de trabajo que SOX9 está sobre expresada en el ACDP (Zhou et al., 2018; Sun et al., 2013). Por lo que, tomando en cuenta todo esto nos preguntamos si esta proteína era capaz de regular positivamente la transcripción del promotor del gen H2A.Z.2.

Para evaluar esta posibilidad, realizamos un ensayo de luciferasa con la construcción (pGL3-SOXMut) que contenía un fragmento del promotor de H2A.Z.2 de 735 pb en el que 3 bases de tres de los 6 sitios SOX de secuencia consenso **TTGTTT** ubicados entre las posiciones -570 a -502 fueron cambiados por los nucleótidos **CCT**. Este fragmento (735 pb) fue amplificado empleando un oligo sentido que abarca de la posición -535 a -448, el cual contiene 3 sitios SOX mutados (sustitución de las bases TTG por CCT). Adicionalmente se amplificó un fragmento del mismo tamaño, pero a diferencia del anterior, se utilizó un oligo sentido que contiene la secuencia “wild type” (los sitios SOX no fueron modificados) con el cual se generó la construcción pGL3-SOXWT. En ambos casos se empleó el oligo “Rvs-Hind-2”.

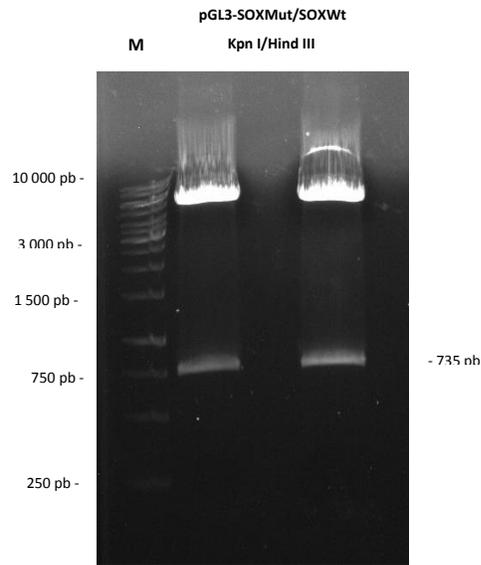


Figura 33 Digestión de las construcciones pGL3-SOXMut/SOXWT.
 Cada una de las construcciones fueron digeridas con las enzimas de restricción Kpn I y Hind III y se analizaron en un gel de agarosa al 1%.

Una vez que se obtuvieron las construcciones pGL3-SOXMut y pGL3-SOXWT se digirieron con las enzimas Kpn I y Hind III. Como se observa en la figura 33 ambas construcciones liberaron el producto del tamaño esperado. Finalmente, para estar seguros de que la construcción pGL3-SOXMut contenía los 3 sitios de unión para SOX mutados y que la construcción pGL3-SOXWT contenía los motivos SOX “wildtype”, cada una de éstas se secuenciaron y tras corroborar el cambio de bases nucleóticas (TTG por CCT) en los tres sitios SOX mutados se realizaron los ensayos de luciferasa. En los cuales se esperaba, que de ser alguna de las proteínas SOX las que se unan y regulen positivamente la actividad transcripcional en esta región (-715 a -219) del promotor, entonces al modificar su sitio de unión al ADN como consecuencia, ya no se unirían a estos sitios y la actividad de luciferasa de la construcción pGL3-SOXMut sería similar a la obtenida con las construcciones pGL3-SOXWT y pGL3-500. Contrario a lo que esperábamos la actividad de luciferasa obtenida con ambas construcciones (pGL3-SOXMut y pGL3-SOXWT) fue similar (Figura 34).

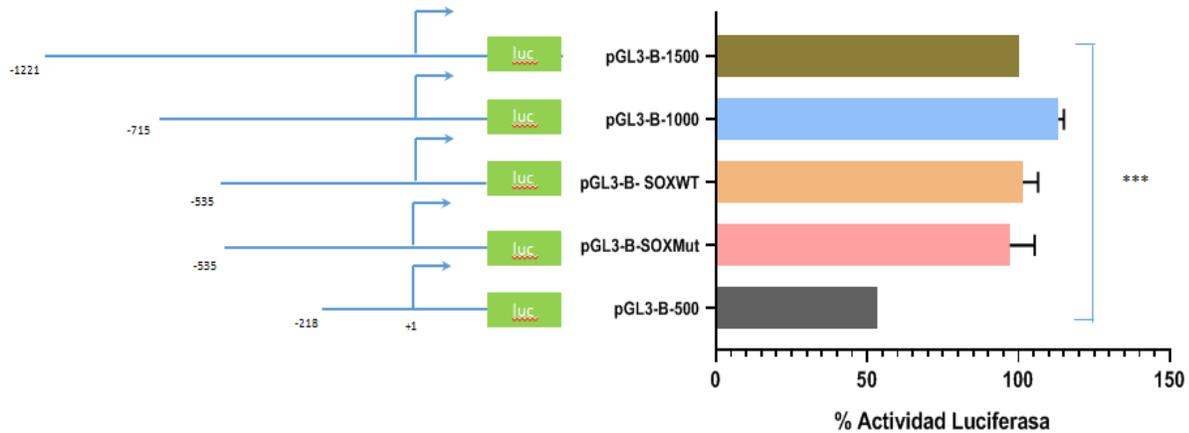


Figura 34 Los sitio SOX ubicados entre las posiciones -570 a -502 no regulan positivamente la actividad transcripcional del promotor

Se realizó un ensayo de luciferasa con la construcción pGL3-SOXMut la cual contiene los sitios SOX mutados, la actividad de luciferasa obtenida con esta construcción se comparó con una construcción adicional la cual contiene el mismo inserto pero con la secuencia *wild type*.

Este resultado sugiere que al menos los tres sitios SOX ubicados entre los nucleótidos -570 a -502 no son funcionales y que los factores de transcripción SOX no controlan positivamente la actividad transcripcional del promotor H2A.Z.2, aunque habría que investigar si los tres sitios restantes, que no fueron mutados, podrían ser funcionales. Finalmente esto también genera la pregunta de qué factores de transcripción podrían ser los que se estén uniendo al promotor del gen H2A.Z.2.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

H2A.Z es una variante de la histona canónica H2A, la cual participa en diferentes procesos celulares como: la formación de heterocromatina, regulación transcripcional, reparación del ADN, memoria epigenética, entre otros (Giaino et al., 2019). De todos estos procesos la función más estudiada ha sido su papel en la regulación transcripcional (Vardabasso et al., 2014). Recientemente se ha demostrado que la expresión de los genes H2A.Z.1 y H2A.Z.2 que codifican para la variante de histona H2A.Z esta alterada en diferentes tipos de cáncer incluyendo el adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP) y que esto contribuye a la progresión de la enfermedad (Vardabasso et al., 2014; Ávila et al., 2016). Sin embargo a pesar de la importancia de esta variante de histona, hasta la fecha no se ha estudiado cómo se regula la expresión del gen H2A.Z.2.

Si tomamos en cuenta que el inicio de la transcripción es reconocido como el principal punto de control de la expresión génica en eucariontes (Maston, Evans, & Green, 2006), es que en este trabajo nos preguntamos si la expresión de este gen podría ser regulada en parte, por la región promotora del gen H2A.Z.2, por lo que entonces procedimos a identificar y caracterizar al promotor del gen H2A.Z.2.

Los resultados de este trabajo indican que el sitio de inicio de la transcripción del gen H2A.Z.2 está localizado a una distancia de 292 pb río arriba con respecto al ATG y que la región de 1421pb localizada a 92 pb río arriba del ATG es capaz de conducir la expresión del gen. Además, nuestros hallazgos sugieren que el promotor de H2A.Z.2 es “bipartito”, el cual está formado por un promotor mínimo y por elementos regulatorios en *cis* a los que se le unen factores de transcripción que activan y reprimen la transcripción del gen H2A.Z.2.

EL promotor del gen H2A.Z.2 tiene una transcripción “focused” y posee un *core motif* tipo Inr en el cual está contenido el TSS.

El principal punto de regulación de los genes que codifican para las proteínas ocurre durante la transcripción la cual, a su vez puede ser regulada en diferentes etapas como el inicio, la elongación y la terminación de la transcripción. Siendo el inicio de la transcripción el principal punto de control de la transcripción (Maston et al., 2006). A su vez, el inicio de la transcripción puede ser

regulado a nivel de la cromatina y a nivel del promotor (Maston et al., 2006). De tal modo que, para que un gen se exprese primero se requiere que ocurra un remodelamiento de la cromatina. Es decir, que la estructura de la cromatina de un gen en particular adquiriera una estructura más relajada y accesible para que permita el acceso de los FT (Li et al., 2007).

Los genes que codifican para proteínas son transcritos por la ARNpol II y se ha descrito que tienen dos clases de elementos regulatorios: el promotor y los elementos regulatorios distales como los *enhancers*, *insulators* y regiones de control de *locus (LCR)*(Maston et al., 2006). A su vez, el promotor está formado por un promotor mínimo (o “core promoter”) que está constituido por secuencias cortas (*core motifs*) de 5 a 8 nucleótidos que permiten la unión de los factores generales de la transcripción (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE y TFIIH) para que se ensamble el complejo de pre inicio de la transcripción (PIC) y los elementos regulatorios *upstream* a los que se unen factores que activan o reprimen la transcripción (Maston et al., 2006).

Debido a que el objetivo de este trabajo consistió en identificar y caracterizar al promotor del gen H2A.Z.2 inicialmente, procedimos a determinar donde se localiza la posición “+1” o el sitio de inicio de la transcripción (TSS), ya que esto nos permitiría establecer la localización del promotor del gen H2A.Z.2. Por lo que, para conocer en donde podría estar localizado el TSS se realizó un análisis bio informático en el que se buscó la presencia de varias marcas de histonas a lo largo del gen H2A.Z.2. Se buscaron estas marcas ya que ha sido reportado que marcas epigenéticas como: la histona H3 trimetilada en la lisina 4 (H3K4me3), la histona H3 acetilada en la lisina 9 (H3K9ac), y la histona H3 acetilada en la lisina 27 (H3K27ac) están enriquecidas alrededor del TSS de los genes transcripcionalmente activos (Li et al., 2007). De esta forma, al mapear la ubicación de la H3K4me3, H3K9ac y H3K27ac en la región *upstream* del gen H2A.Z.2 logramos determinar que el probable TSS del gen H2A.Z.2 se ubica a 438 pb río arriba del ATG.

Posteriormente mediante ensayos de RT-PCR y la técnica de RACE 5', pudimos establecer experimentalmente que la posición "+1" corresponde a una G (guanina) localizada a una distancia de 292 pb río arriba del ATG. Además, al realizar el ensayo de RACE 5' obtuvimos un solo producto amplificado lo que sugiere que el promotor mínimo posee un solo TSS.

En la literatura ha sido descrito que con base al número de sitios de inicio de la transcripción, un promotor mínimo puede ser clasificado como "focused" si solo posee un TSS bien definido, "dispersed" si tiene múltiples y cercanos TSS los cuales son empleados con la misma frecuencia, o mixtos si poseen varios TSS débiles con un sitio de inicio de la transcripción predominante (Juvenger & Kadonaga, 2010). Por lo que tomando en cuenta los resultados obtenidos en la técnica RACE 5', el promotor mínimo del gen H2A.Z.2 se podría tratar de un promotor "focused". Sin embargo, no descartamos la opción que pudiera tratarse de un promotor "mixto" los cuales tienen un TSS predominante.

La transcripción "focused" de un promotor mínimo típicamente inicia dentro del *core motif* "Inr" (iniciador) en el cual está contenido el TSS. La secuencia consenso que se ha establecido para este *core motif* es "YYANWYY" (Y= C/T, W= A/T, y N= A/T/G/C) donde el nucleótido A (adenina) usualmente se designa como la posición "+1" aunque realmente la transcripción no inicie en este sitio (Kugel & Goodrich, 2017). Sin embargo, otros estudios en donde analizaron los TSS a nivel del genoma completo han propuesto una secuencia consenso más corta para el Inr la cual es "YR" donde la "Y" es una pirimidina y la "R" corresponde a la posición "+1" y puede ser una A o G (guanina) (Frith et al., 2008; Kugel & Goodrich, 2017). Acorde con esto, los resultados obtenidos con la secuenciación del producto del RACE 5' indican que la posición "+1" corresponde a una G localizada a una distancia de 292 pb río arriba del ATG y que esta G podría estar contenida dentro de un *core motif* tipo "Inr" de secuencia consenso "YR".

El promotor mínimo del gen H2A.Z.2 está localizado a 88 pb río abajo del TSS y se trata de un promotor “TATA-less”.

Para determinar si la región localizada río arriba del TSS funcionaba como un promotor se realizó un ensayo de gen reportero. Esto nos permitió establecer que la región de 1421 pb situada 92 pb río arriba de ATG era capaz de conducir la expresión del gen de luciferasa y por lo tanto funcionaba como un promotor. Mediante un análisis de deleciones del extremo 5' del fragmento de 1421 pb, logramos establecer una región de 113 pb que fue capaz de mantener niveles basales de la transcripción del gen reportero de la luciferasa. Sugiriendo que esta región localizada a 88 pb río abajo del TSS (+89 a +200) contenía al promotor mínimo del gen H2A.Z.2. Por lo que, este resultado indica que el “core promoter” está ubicado río abajo del TSS sugiriendo la presencia de *core motifs* situados río abajo del TSS.

Consistente con esto, mediante una búsqueda *in silico* de los probables elementos *in cis* presentes dentro del promotor mínimo de H2A.Z.2, encontramos que de manera similar a lo reportado por Dryhurst (2009) el promotor de H2A.Z.2 carece de *core motifs* situados río arriba del TSS como una probable caja TATA, la cual se sabe está localizada aproximadamente 30 pb río arriba al TSS (Juven-Gershon & Kadonaga, 2010), por lo que el promotor mínimo del gen H2A.Z.2 correspondería a un promotor “TATA-less”.

El mapeo de varios promotores “TATA less” ha establecido que en ausencia de una caja TATA, existen *core motifs* ubicados río abajo del TSS como el DPE (*downstream promoter element*) o al MTE (*Motif ten element*). Estos elementos (DPE, MTE) suplen la función de la caja TATA, es decir permiten la unión del TFIID a través de sus TAF's (Factores asociados a la TBP) (Haberle & Stark, 2018). En este sentido los datos que obtuvimos del análisis *in silico* indican que en la posición +40 a +45 hay una probable secuencia (TGCAAAA) que corresponde a la secuencia consenso del DPE. Sin embargo, se ha establecido que el elemento DPE usualmente está ubicado en la posición +28 a

+33 respecto al sitio "+1"(Juven-Gershon & Kadonaga, 2010). Importantemente, también se ha demostrado que se requiere de un espaciamiento estricto entre el DPE y el Inr para que se reclute al TFIID al promotor mínimo (Haberle & Stark, 2018). Por lo que, considerando nuestros resultados en donde el DPE del gen H2A.Z.2 está más alejado (+40 a +45) que lo reportado en eucariontes (+28 a +23), probablemente este elemento no sea funcional.

Adicionalmente, un análisis estadístico de ~10,000 promotores humanos reveló que solo aproximadamente el 25% de éstos, contienen promotores mínimos constituidos por el elemento DPE, y que otro 25% de estos 10,000 promotores no contiene ninguno de los elementos antes descritos (caja TATA, DPE y MTE) (Maston et al., 2006). Por lo que, en conjunto nuestros hallazgos experimentales y lo reportado en la literatura nos lleva a sugerir que el promotor mínimo de H2A.Z.2 podría contener otros elementos en *cis* posicionados río abajo del TSS no descritos anteriormente o bien que el *core motif* tipo "Inr" es suficiente para dirigir la iniciación de la transcripción por la ARNpol II.

Adicionalmente para corroborar que la región que abarca del nucleótido +89 a +200 corresponde al promotor mínimo, realizamos un experimento de luciferasa con una construcción que únicamente contenía las 1221 pb situadas río arriba del TSS y carecía de la región donde previamente habíamos establecido se localizaba el promotor mínimo. Por lo que, nosotros esperábamos que al no contener la región mínima necesaria para que ensamblara el PIC, no se expresaría el gen de la luciferasa. Sin embargo, nuestros resultados indican que esta región de 1221 pb fue capaz de activar la transcripción. Lo anterior se podría explicar si en esta región del promotor existen secuencias presentes capaces de reclutar el PIC. Pero también este resultado enfatiza que la región de +88 a +200 es necesaria para que el promotor de H2A.Z.2 alcance la mayor actividad transcripcional, ya que esta construcción retuvo solo un 20% de la actividad de

luciferasa con respecto a la construcción pGL3-1500. Lo que indicaría que efectivamente es necesaria la región donde se localiza el promotor mínimo para que las señales de activación y/o represión sean llevadas al PIC y de esta forma se regule la expresión del gen.

El promotor del gen H2A.Z.2 contiene probables elementos en *cis* en la región comprendida entre -218 a -74 que podrían reclutar proteínas represoras de la transcripción

Además de determinar la región donde está ubicado el “core promoter”, la serie de deleciones del fragmento “F-1500” nos permitió determinar la posible localización y función de los elementos regulatorios *upstream*. De acuerdo con los ensayos de luciferasa, el promotor de H2A.Z.2 presenta al menos dos regiones que podrían contener elementos en *cis* importantes para la actividad transcripcional del gen H2A.Z.2.

Una de estas regiones está comprendida entre la posición -218 a -74 relativo al TSS. El ensayo de gen reportero muestra que al eliminar esta región en la construcción pGL3-250 (que abarca de -73 a +200) la actividad de luciferasa vuelve a incrementarse respecto a la construcción pGL3-500 (-218 a +200). Esto sugiere que la región de -218 a -74 probablemente se unan proteínas con una función represora de la transcripción. De acuerdo al análisis *in silico* que se realizó para determinar los probables factores de transcripción que podrían unirse al promotor, muestra que algunos de los posibles FT que podrían unirse a esta región (-218 a -74) corresponden a proteínas con una función represora, lo cual refuerza los resultados del ensayo de gen reportero.

En este sentido, los datos obtenidos mediante la búsqueda *in silico* de los probables FTs indican que el promotor de H2A.Z.2 contiene probable sitios de unión para los factores de transcripción MZF-1 y IK-1, los cuales se ha reportado tienen una función represora en la transcripción (Vishwamitra et al., 2015). También en el trabajo de Vishwamitra (2015) se demostró que ambos factores de transcripción (MZF-1 y IK-1) cooperan para regular negativamente la expresión del gen

IGF-IR (Receptor del factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I). Por lo que, para corroborar si estos factores de transcripción se unen y regulan el promotor de H2A.Z.2, se podría generar una construcción con el fragmento del promotor F-500 en donde los motivos de unión para estos dos FTs presentes en la región de -218 a -74 sean mutados para posteriormente realizar los ensayos de luciferasa.

El promotor del gen H2A.Z.2 contiene elementos en *cis* ubicados en la posición de -715 a -219 que podrían reclutar proteínas activadoras de la transcripción

La segunda región identificada con la serie de deleciones del promotor, se ubica entre las posiciones -715 a -219, relativo al TSS. Acorde a nuestros resultados, en esta región (-715 a -219) probablemente existen elementos en *cis* a los cuales se le unen factores de transcripción que controlan positivamente la transcripción del gen H2A.Z.2. Esto porque al eliminar los 497 pb que comprenden esta región, la actividad de luciferasa disminuye en un 50% respecto a las construcciones (pGL3-1500 y pGL3-1000) que si contienen esta región del promotor. Por lo que para caracterizar aún más esta región realizamos un análisis *in silico* en el que encontramos que todos los factores de transcripción (AP-1, SP-1, CREB, FOXA2, SOX, PAX-2, Figura 32) que podrían unirse a esta región del promotor del gen H2A.Z.2 pueden funcionar como activadores. Esto correlaciona con los resultados obtenidos del análisis de deleciones (Figura 29). De estos probables factores de transcripción que se unen a la región de -715 a -219 algunos son designado como ubicuos (porque son expresados en todos los tejidos), como SP-1, AP-1 y CREB (Mayr & Montminy, 2001). Mientras que otros son específicos tejido (en este caso del páncreas) como FOXA2, PAX-2 (MacDonald, Swift, & Real, 2010).

En este punto surge la pregunta: ¿Cómo estos factores de transcripción podrían tener una función activadora en la transcripción? Por mencionar solo algunos, en el caso del factor de transcripción CREB (proteína de unión al elemento de respuesta AMP cíclico), al ser fosforilado es capaz de

unirse a los promotores de los genes a través de su dominio de unión al ADN, y una vez unido al promotor puede reclutar a una histona acetil transferasa, p300. Esta última, es una enzima modificadora de la cromatina que acetila el extremo amino de las histonas creando una cromatina accesible y en consecuencia permitiendo la unión de otros FTs (Mayr & Montminy, 2001).

Por otro lado FOXA2 es un factor de transcripción tejido específico, que es expresado tempranamente durante el desarrollo del páncreas (Dassaye, Naidoo, & Cerf, 2016). Este FT es considerado un factor pionero de la transcripción ya que tiene la capacidad de unirse al ADN nucleosomal que se encuentra en una cromatina compacta, y es capaz de remodelar la cromatina del promotor (Iwafuchi-Doi, 2019). Se ha descrito que la unión de FOXA2 desplaza localmente a la histona H1 lo cual vuelve más accesible al ADN que se encuentra alrededor del nucleosoma, permitiendo de esta manera la unión de otros factores de la transcripción(Iwafuchi-Doi, 2019).

Un análisis más detallado de esta región reveló la presencia de seis probables motivos de unión para los factores de transcripción SOX distribuidos a lo largo de esta región de 497 pb (-715 a -219). Estos seis sitios SOX están distribuidos de la siguiente manera: 1 de ellos se localiza entre el nucleótido -715 a -552; 4 de ellos entre la posición -570 a -386, y solo un sitio SOX de -405 a -219 (posiciones relativas al TSS). Este dato nos pareció relevante ya que la familia de proteínas SOX es un grupo de reguladores transcripcionales, y en el humano han sido identificadas alrededor de 20 proteínas SOX (Aguilar-Medina et al., 2019; She & Yang, 2015). En donde, todos los miembros de esta familia comparten un dominio de unión de ADN conservado que reconoce la secuencia consenso (A/T)(A/T)CAA(A/T)G y se caracterizan por regular procesos de diferenciación y desarrollo de diversos tejidos (She & Yang, 2015).

Debido a que la línea celular de adenocarcinoma ductal pancreático (PANC-1) fue nuestro modelo de estudio y tomando en cuenta la presencia de 6 probables sitios SOX nos dimos a la tarea de

averiguar si alguna de las 20 proteínas SOX era específica de páncreas. De acuerdo a la literatura encontramos que SOX9 no solo se expresa en el tejido neuronal sino también en una población de células progenitoras pancreáticas. En estas células progenitoras pancreáticas SOX9 es esencial para su mantenimiento, proliferación y supervivencia (Reichert & Rustgi, 2011). Pero además se encontró que la expresión de SOX9 se mantiene tras la diferenciación de los progenitores pancreáticos en los progenitores exócrinos y que persiste en las células ductales del páncreas pero no en las células acinares (Reichert & Rustgi, 2011).

Aunado a lo anterior, también se ha reportado por varios grupos de trabajo que SOX9 se encuentra sobre expresado a nivel de mensajero y de proteína en líneas celulares de ACDP incluyendo la línea celular PANC-1 (Sun et al., 2013; Zhou et al., 2018). También, se ha demostrado por David (2012) que la sobre expresión de SOX9 junto con la mutación de KRAS^{G12D} en las células acinares son capaces de inducir el desarrollo de la metaplasia acinar a ductal (ADM), la neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN) y finalmente el ACDP (David et al., 2012). En este mismo estudio mostraron que en ausencia de SOX9 se bloquea completamente el desarrollo de la ADM y las lesiones PanINs aun en la presencia del KRAS^{G12D} mutado. Por otro lado Sun (2013) reportó que SOX9 confiere propiedades de invasividad a las células PANC-1 y que muy probablemente ocurra por alterar la expresión de genes involucrados en la transición epitelio mesénquima. Esto sugiere que este SOX9 puede alterar la expresión de una gran cantidad de genes de manera temprana y durante la progresión del ACDP. Por lo que considerando estos antecedentes nos preguntamos si SOX9 podría unirse al promotor de H2A.Z.2.

Para investigar esta posibilidad, nuevamente mediante un ensayo de luciferasa determinamos la actividad transcripcional de una construcción en la que tres bases del motivo de unión (TTGTTT) para las proteínas SOX fueron mutadas por -CCT- (pGL3-SOXmut). Estos cambios se realizaron en

tres de los cuatro sitios SOX presentes en la región de -570 a -386. Por lo que, si en estos sitios realmente se une alguna proteína SOX y tiene una función activadora de la transcripción entonces la actividad de luciferasa sería similar a la obtenida con la construcción pGL3-500. Sin embargo, como se mencionó, debido a que todas las proteínas que pertenecen a esta familia, reconocen el mismo motivo unión al ADN aunque con distintas afinidades, con este experimento únicamente se podría sugerir que se trata de un FT SOX pero no de SOX9 (Aguilar-Medina et al., 2019).

Contrario a lo que esperábamos obtuvimos que la actividad de transcripcional de la construcción pGL3-SOXmut fue igual a la obtenida con la construcción pGL3-SOXWT (sitios SOX sin modificar). Por lo que, estos resultados sugirieren dos posibilidades: la primera es que si las proteínas SOX se unen al promotor del gen H2A.Z.2 sea a través de los 3 sitios probables restantes que no fueron modificados. Por lo que, para probar lo anterior podríamos utilizar la misma estrategia, es decir, mutar estos 3 sitios para SOX y realizar los ensayos de luciferasa. La segunda posibilidad es que realmente estos sitios no sean funcionales y en consecuencia que no sean los responsables de activar la transcripción en esta región del promotor (-715 a -219). De ser este el caso, para identificar las proteínas que se unen tanto en la región de -715 a -219 como a la región de -218 a -73 (la cual probablemente tenga una función represora) podríamos realizar un ensayo de oligonucleótido *pulldown*. Para el cual diseñaríamos varias sondas de ADN que abarquen en su totalidad ambas regiones, para después ponerlas a interactuar con los extractos nucleares de las células PANC-1 y por último identificar las proteínas mediante espectrometría de masas.

Los promotores de los genes H2A.Z.1 y H2A.Z.2 están constituidos por diferentes elementos en *cis*

Previamente se mencionó, que los genes H2A.Z.1 y H2A.Z.2 codifican para la variante de histona H2A.Z, en donde este último gen (H2A.Z.2) genera por splicing alternativo dos isoformas (Z.2.1 y Z.2.2) de esta variante de histona. Interesantemente, se reportó que el transcrito del gen H2A.Z.1

pero no las isoformas del gen H2A.Z.2 está sobre expresado cáncer de mama, próstata y carcinoma hepático (Hua et al., 2008; Yang et al., 2016). En el estudio realizado por Hua (2008) se encontró que en cáncer de mama en respuesta al estrógeno, el factor de transcripción Myc se une al promotor del gen H2A.Z.1, pero no al promotor del gen H2A.Z.2 y de esta manera incrementa la transcripción de H2A.Z.1. Esto genera la pregunta si estas diferencias en la expresión de ambos genes podrían ser atribuidas en parte a los sitios de unión para los factores de transcripción presentes en ambos promotores. Para estudiar esto, realizamos una búsqueda *in silico* de los probables sitios de unión a FTs presentes en el promotor del gen H2A.Z.1. De acuerdo a los datos del análisis *in silico*, en concordancia a lo reportado por Dryhurst (2009), encontramos diferencias claras en ambos promotores. Por ejemplo la presencia de una probable caja TATA perfectamente posicionada (-25 a -30 relativo al TSS), así como la presencia de tres probables cajas CAAT, las cuales son reconocidas por el factor de transcripción NF-Y1, en el promotor del gen H2A.Z.1 pero no en el promotor del gen H2A.Z.2 Figura 35. También el análisis arrojó la presencia de tres probables sitios para el factor de transcripción USF y dos probables sitios para el factor de transcripción AhR/ARNT en el promotor de H2A.Z.1, los cuales están ausentes en el promotor del gen H2A.Z.2 esto podría explicar diferencias en el patrón de expresión entre ambos genes.

En contraste a lo reportado en los otros tipos de cáncer, nuestro grupo de trabajo encontró interesantemente, que en el ACDP las tres isoformas (Z.1, Z.2.1, Z.2.2) de H2A.Z están sobre expresadas (Ávila et al., 2016). Lo que sugiere en este sentido, que probablemente los promotores de H2A.Z.1 y H2A.Z.2 podrían compartir sitios de unión para FT. En línea con esto, el análisis *in silico* de ambos promotores reveló probables sitios para factores de transcripción presentes como SP-1, AP-2 y AP-1 (Figura 35). Por lo que creemos que sería interesante evaluar la posibilidad de que estos factores de transcripción sean, en parte los responsables de la sobre expresión de los transcritos de las tres isoformas de H2A.Z en el ACDP.

Finalmente, ya que estamos interesados en saber si la expresión del gen H2A.Z.2 podría ser alterada en parte por la regulación a nivel del promotor en el contexto del ACDP, y en este sentido la presencia y/o ausencia de FTs podrían incrementar los niveles de expresión de este gen, podríamos realizar los ensayos de luciferasa y oligonucleótido *pulldown* tanto en la línea celular no tumorigénica (hTERT) como la línea celular PANC-1 lo que nos permitiría identificar FTs que estén presentes o ausentes en una u otra línea celular.

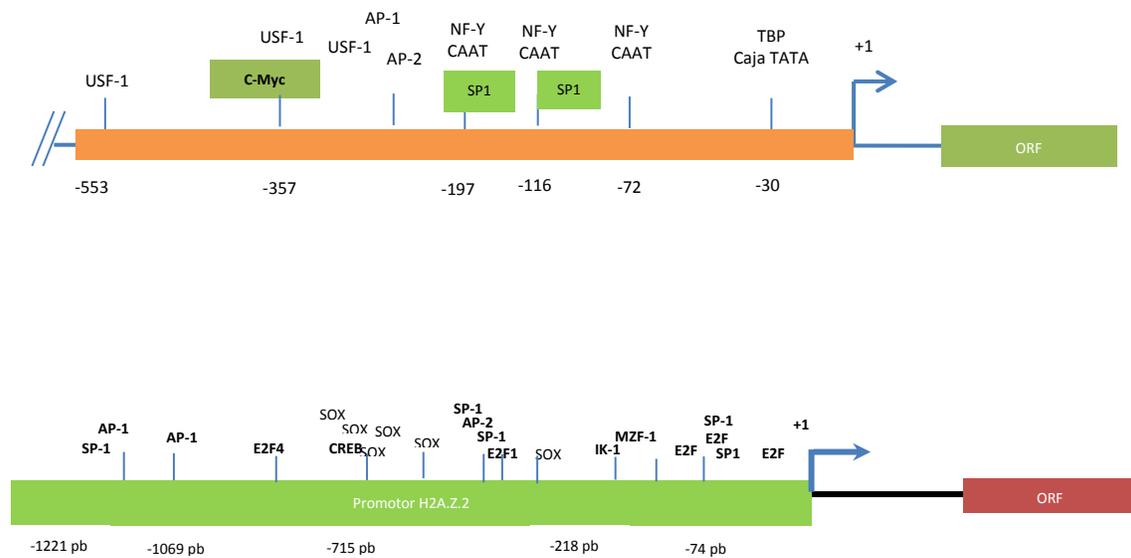


Figura 35 Diagrama de los probables sitios de unión para factores de transcripción (FTs) presentes en el promotor del gen H2A.Z.1 y H2A.Z.2

A) Diagrama del promotor H2A.Z.1 la Búsqueda *in silico* se realizó empleando los mismos programas utilizados para el análisis de la secuencia del promotor de H2A.Z.2 (TRANSFAC, TFBIND INPUT, PROMO y UCSC *Genome Browser*. Los factores de transcripción que se muestran en cuadros verdes son aquellos que han sido demostrados experimentalmente B) Diagrama promotor H2A.Z.2.

CONCLUSIONES

El presente trabajo nos permitió identificar y realizar una caracterización preliminar del promotor del gen H2A.Z.2 con lo que podemos concluir:

- El sitio de inicio de la transcripción del gen H2A.Z.2 corresponde a una guanina situada a 292 pb río arriba del ATG, esta guanina podría formar parte de un “core motif” tipo Inr.
- La región de 1221 pb y 200 pb ubicadas río arriba y río abajo del TSS respectivamente, es capaz de conducir la expresión del gen H2A.Z.2.
- Esta región de 1421 corresponde por tanto al promotor del gen H2A.Z.2, el cual tiene una estructura “bipartita” formada por un promotor mínimo y elementos regulatorios *upstream*.
- El promotor mínimo corresponde a una región de 113 pb ubicadas río abajo del TSS
- Los elementos regulatorios que constituyen al promotor de H2A.Z.2 y que parecen importantes para su actividad transcripcional son al menos dos.
- Uno de éstos se ubica en la región de -715 a -219 pb a la cual probablemente se le unan proteínas activadoras de la transcripción.
- Esta región contiene sitios probables para factores de transcripción como FOXA2, CREB, AP-1, SP-1, PAX-2.
- El otro elemento se localiza entre el nucleótido -218 a -74 y probablemente se le unan proteínas con una función represora en la transcripción.
- Este elemento contiene sitios probables para factores de transcripción que pueden funcionar como represores como Mzf-1 e IK-1.

PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se realizó una caracterización preliminar del promotor del gen H2A.Z.2. Por lo que, con base en los hallazgos realizados se propone seguir con la identificación de los elementos en *cis* y factores en *trans* que controlan la transcripción del gen H2A.Z.2. Para lo cual se proponen las siguientes perspectivas de trabajo.

- Determinar mediante ensayos de luciferasa si los factores de transcripción AP-1, SP-1, AP-2 se unen a la región de -715 a -219 pb y son capaces de activar la transcripción empleando construcciones con el promotor del gen H2A.Z.2 que contenga mutaciones en los sitios de unión para estos factores de transcripción.
- Determinar mediante ensayos de luciferasa si los factores de transcripción MZF-1, IK-1, se unen y son capaces de reprimir la transcripción en la región de -218 a -74 pb, mediante el empleo de construcciones con el promotor del gen H2A.Z.2 que contenga mutaciones en los sitios de unión para estos factores de transcripción.
- Identificar a los Factores de transcripción que se unen en ambas regiones (-715 a -219, y -218 a -74) mediante ensayos de super retardamiento.
- Determinar si la sobreexpresión del gen H2A.Z.2 en la línea celular PANC-1 se debe en parte a FT que en un contexto normal (no tumorigénico) no estarían regulando la actividad transcripcional del gen. Para lo cual se realizarán los experimentos en la línea celular no tumorigénica de células ductales de páncreas y en la línea celular de ACDP (PANC-1)

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Medina, M., Avendaño-Félix, M., Lizárraga-Verdugo, E., Bermúdez, M., Romero-Quintana, J. G., Ramos-Payan, R., ... López-Camarillo, C. (2019). SOX9 Stem-Cell Factor: Clinical and Functional Relevance in Cancer. *Journal of Oncology*, 2019, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2019/6754040>
- Bedford, M. T., & Clarke, S. G. (2009). Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Molecular Cell*, 33(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.12.013>
- Dassaye, R., Naidoo, S., & Cerf, M. E. (2016). Transcription factor regulation of pancreatic organogenesis, differentiation and maturation. *Islets*, 8(1), 13–34. <https://doi.org/10.1080/19382014.2015.1075687>
- David, S. P., Murthy, N. V., Rabiner, E. A., Munafó, M. R., Johnstone, E. C., Jacob, R., ... Grasby, P. M. (2012). Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 22(6), 737–750. <https://doi.org/10.1038/nature09421>. Oxidative
- Diaferia, G. R., Balestrieri, C., Prosperini, E., Nicoli, P., Spaggiari, P., Zerbi, A., & Natoli, G. (2016). Dissection of transcriptional and cis-regulatory control of differentiation in human pancreatic cancer. *The EMBO Journal*, 35(6), 595–617. <https://doi.org/10.15252/embj.201592404>
- Distler, M., Aust, D., Weitz, J., Pilarsky, C., & Grützmann, R. (2014). Precursor Lesions for Sporadic Pancreatic Cancer : PanIN , IPMN , and MCN, 2014(Figure 2). <https://doi.org/10.1155/2014/474905>
- Dryhurst, D., Ishibashi, T., Rose, K. L., Eirín-López, J. M., McDonald, D., Silva-Moreno, B., ... Ausió, J. (2009). Characterization of the histone H2A.Z-1 and H2A.Z-2 isoforms in vertebrates. *BMC Biology*, 7, 1–16. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-86>
- Frith, M. C., Valen, E., Krogh, A., Hayashizaki, Y., Carninci, P., & Sandelin, A. (2008). A code for transcription initiation in mammalian genomes. *Genome Research*, 18(1), 1–12. <https://doi.org/10.1101/gr.6831208>
- Gaiimo, B. D., Ferrante, F., Herchenröther, A., Hake, S. B., & Borggreffe, T. (2019). The histone variant H2A.Z in gene regulation. *Epigenetics & Chromatin*, 12(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s13072-019-0274-9>
- Guillén-Ponce, C., Blázquez, J., González, I., de-Madaria, E., Montáns, J., & Carrato, A. (2017). Diagnosis and staging of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clinical and Translational Oncology*, 19(10), 1205–1216. <https://doi.org/10.1007/s12094-017-1681-7>
- Haberle, V., & Stark, A. (2018). Eukaryotic core promoters and the functional basis of transcription initiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(10), 621–637. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0028-8>
- Hangauer, M. J., Vaughn, I. W., & McManus, M. T. (2013). Pervasive Transcription of the Human Genome Produces Thousands of Previously Unidentified Long Intergenic Noncoding RNAs. *PLoS Genetics*, 9(6), e1003569. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003569>

- HATCH, C. L., & BONNER, W. M. (1995). Characterization of the Proximal Promoter of the Human Histone H2A.Z Gene. *DNA and Cell Biology*, 14(3), 257–266. <https://doi.org/10.1089/dna.1995.14.257>
- Ho, J., Li, X., Zhang, L., Liang, Y., Hu, W., Yau, J. C. W., ... Wu, W. K. K. (2019). Translational genomics in pancreatic ductal adenocarcinoma: A review with re-analysis of TCGA dataset. *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.04.004>
- Holoch, D., & Moazed, D. (2015). RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. *Nature Reviews Genetics*, 16(2), 71–84. <https://doi.org/10.1038/nrg3863>
- Hruban, R. H., Maitra, A., & Goggins, M. (2008). Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 1(4), 306–316. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18787611>
- Hua, S., Kallen, C. B., Dhar, R., Baquero, M. T., Mason, C. E., Russell, B. A., ... White, K. P. (2008). Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone variant H2A.Z associated with breast cancer progression. *Molecular Systems Biology*, 4(188), 1–14. <https://doi.org/10.1038/msb.2008.25>
- Iguchi, E., Safgren, S. L., Marks, D. L., Olson, R. L., & Fernandez-Zapico, M. E. (2016). Pancreatic cancer, a Mis-interpreter of the epigenetic language. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 89(4), 575–590.
- Ilic, M., & Ilic, I. (2016). Epidemiology of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(44), 9694–9705. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i44.9694>
- Iwafuchi-Doi, M. (2019). The mechanistic basis for chromatin regulation by pioneer transcription factors. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*, 11(1), e1427. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1427>
- Jouvet, N., & Estall, J. L. (2017). The pancreas: Bandmaster of glucose homeostasis. *Experimental Cell Research*, 360(1), 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.03.050>
- Juliano, C. N., Izetti, P., Pereira, M. P., dos Santos, A. P., Bravosi, C. P., Abujamra, A. L., ... Edelweiss, M. I. A. (2016). H4K12 and H3K18 Acetylation Associates With Poor Prognosis in Pancreatic Cancer. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 24(5), 337–344. <https://doi.org/10.1097/PAI.000000000000194>
- Juven-Gershon, T., & Kadonaga, J. T. (2010). Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Developmental Biology*, 339(2), 225–229. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2009.08.009>
- Kallen, A. N., Zhou, X.-B., Xu, J., Qiao, C., Ma, J., Yan, L., ... Huang, Y. (2013). The Imprinted H19 LncRNA Antagonizes Let-7 MicroRNAs. *Molecular Cell*, 52(1), 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.027>
- Katsuno, Y., Lamouille, S., & Derynck, R. (2013). TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Current Opinion in Oncology*, 25(1), 76–84. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e32835b6371>

- Khan, M. A., Azim, S., Zubair, H., Bhardwaj, A., Patel, G. K., Khushman, M., ... Singh, A. P. (2017). Molecular drivers of pancreatic cancer pathogenesis: Looking inward to move forward. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(4). <https://doi.org/10.3390/ijms18040779>
- Kim, K., Punj, V., Choi, J., Heo, K., Kim, J.-M., Laird, P. W., & An, W. (2013). Gene dysregulation by histone variant H2A.Z in bladder cancer. *Epigenetics & Chromatin*, *6*(1), 34. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-6-34>
- Kugel, J. F., & Goodrich, J. A. (2017). Finding the start site: redefining the human initiator element. *Genes & Development*, *31*(1), 1–2. <https://doi.org/10.1101/gad.295980.117>
- Li, B., Carey, M., & Workman, J. L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell*, *128*(4), 707–719. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.015>
- Lomberk, G. A., & Urrutia, R. (2015). The Triple-Code Model for Pancreatic Cancer: Cross Talk Among Genetics, Epigenetics, and Nuclear Structure. *The Surgical Clinics of North America*, *95*(5), 935–952. <https://doi.org/10.1016/j.suc.2015.05.011>
- MacDonald, R. J., Swift, G. H., & Real, F. X. (2010). Transcriptional control of acinar development and homeostasis. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, *97*(C), 1–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385233-5.00001-5>
- Maitra, A., & Hruban, R. H. (2008). Pancreatic Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, *3*(1), 157–188. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154305>
- Manuyakorn, A., Paulus, R., Farrell, J., Dawson, N. A., Tze, S., Cheung-Lau, G., ... Dawson, D. W. (2010). Cellular Histone Modification Patterns Predict Prognosis and Treatment Response in Resectable Pancreatic Adenocarcinoma: Results From RTOG 9704. *Journal of Clinical Oncology*, *28*(8), 1358–1365. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.5639>
- Marchese, F. P., Raimondi, I., & Huarte, M. (2017). The multidimensional mechanisms of long noncoding RNA function. *Genome Biology*, *18*(1), 206. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1348-2>
- Maston, G. A., Evans, S. K., & Green, M. R. (2006). Transcriptional Regulatory Elements in the Human Genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *7*(1), 29–59. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.7.080505.115623>
- Mayr, B., & Montminy, M. (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor creb. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *2*(8), 599–609. <https://doi.org/10.1038/35085068>
- McCleary-Wheeler, A. L., Lomberk, G. A., Weiss, F. U., Schneider, G., Fabbri, M., Poshusta, T. L., ... Fernandez-Zapico, M. E. (2013). Insights into the epigenetic mechanisms controlling pancreatic carcinogenesis. *Cancer Letters*, *328*(2), 212–221. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.10.005>
- Ouaïssi, M., Sielezneff, I., Silvestre, R., Sastre, B., Bernard, J.-P., Lafontaine, J. S., ... Ouaiissi, A. (2008). High Histone Deacetylase 7 (HDAC7) Expression Is Significantly Associated with Adenocarcinomas of the Pancreas. *Annals of*

Surgical Oncology, 15(8), 2318–2328. <https://doi.org/10.1245/s10434-008-9940-z>

- Patra, K. C., Bardeesy, N., & Mizukami, Y. (2017). Diversity of Precursor Lesions For Pancreatic Cancer : The Genetics and Biology of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm, 8(4), e86-11. <https://doi.org/10.1038/ctg.2017.3>
- Rahib, L., Smith, B. D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A. B., Fleshman, J. M., & Matrisian, L. M. (2014). Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0155>
- Raphael, B. J., Hruban, R. H., Aguirre, A. J., Moffitt, R. A., Yeh, J. J., Stewart, C., ... Zenklusen, J. C. (2017). Integrated Genomic Characterization of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 32(2), 185–203.e13. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.07.007>
- Reichert, M., & Rustgi, A. K. (2011). Pancreatic ductal cells in development, regeneration, and neoplasia[The Journal of Clinical Investigation2011].pdf, 121(12). <https://doi.org/10.1172/JCI57131.4572>
- Schneider, G., Krämer, O. H., & Saur, D. (n.d.). A ZEB1-HDAC pathway enters the epithelial to mesenchymal transition world in pancreatic cancer. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301576>
- Sevilla, A., & Binda, O. (2014). Post-translational modifications of the histone variant H2AZ. *Stem Cell Research*, 12(1), 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.11.004>
- She, Z. Y., & Yang, W. X. (2015). SOX family transcription factors involved in diverse cellular events during development. *European Journal of Cell Biology*, 94(12), 547–563. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2015.08.002>
- Silverman, B., & Shi, J. (2016). Alterations of Epigenetic Regulators in Pancreatic Cancer and Their Clinical Implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 2138. <https://doi.org/10.3390/ijms17122138>
- Simoes, P. K., Olson, S. H., Saldia, A., & Kurtz, R. C. (2017). Epidemiology of pancreatic adenocarcinoma. *Chinese Clinical Oncology*, 6(3), 24–24. <https://doi.org/10.21037/cco.2017.06.32>
- Singh, G., Singh, S. K., König, A., Reutlinger, K., Nye, M. D., Adhikary, T., ... Ellenrieder, V. (2010). Sequential Activation of NFAT and c-Myc Transcription Factors Mediates the TGF- β Switch from a Suppressor to a Promoter of Cancer Cell Proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(35), 27241–27250. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.100438>
- Solomon, E. I., Augustine, A. J., & Yoon, J. (2010). NIH Public Access, 71(30), 3921–3932. <https://doi.org/10.1039/b800799c.O>
- Srivastava, S. K., Bhardwaj, A., Arora, S., Singh, S., Azim, S., Tyagi, N., ... Singh, A. P. (2015). MYB is a novel regulator of pancreatic tumour growth and metastasis. *British Journal of Cancer*, 113(12), 1694–1703. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.400>
- Sun, L., Mathews, L. A., Cabarcas, S. M., Zhang, X., Yang, A., Zhang, Y., ... Farrar, W. L. (2013). Epigenetic regulation of SOX9 by the NF- κ B signaling pathway in pancreatic cancer stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 31(8), 1454–1466.

<https://doi.org/10.1002/stem.1394>

- Surface, L. E., Fields, P. A., Subramanian, V., Behmer, R., Peach, S. E., Jaffe, J. D., & Boyer, L. A. (2016). poised chromatin in ESCs, *14*(5), 1142–1155. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.100.H2A.Z.1>
- Vardabasso, C., Gaspar-Maia, A., Hasson, D., Pünzeler, S., Valle-Garcia, D., Straub, T., ... Bernstein, E. (2015). Histone Variant H2A.Z.2 Mediates Proliferation and Drug Sensitivity of Malignant Melanoma. *Molecular Cell*, *59*(1), 75–88. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.009>
- Vardabasso, C., Hake, S. B., & Bernstein, E. (2016). Histone variant H2A.Z.2: A novel driver of melanoma progression. *Molecular and Cellular Oncology*, *3*(2), 1–2. <https://doi.org/10.1080/23723556.2015.1073417>
- Vardabasso, C., Hasson, D., Ratnakumar, K., Chung, C.-Y., Duarte, L. F., & Bernstein, E. (2014). Histone variants: emerging players in cancer biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *71*(3), 379–404. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1343-z>
- Vishwamitra, D., Curry, C. V., Alkan, S., Song, Y. H., Gallick, G. E., Kaseb, A. O., ... Amin, H. M. (2015). The transcription factors IκB-1 and MZF1 downregulate IGF-1R expression in NPM-ALK + T-cell lymphoma. *Molecular Cancer*, *14*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0324-2>
- Wang, J., Zhu, C.-P., Hu, P.-F., Qian, H., Ning, B.-F., Zhang, Q., ... Xie, W.-F. (2014). FOXA2 suppresses the metastasis of hepatocellular carcinoma partially through matrix metalloproteinase-9 inhibition. *Carcinogenesis*, *35*(11), 2576–2583. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu180>
- Watanabe, T., Morinaga, S., Akaike, M., Numata, M., Tamagawa, H., Yamamoto, N., ... Miyagi, Y. (2012). The cellular level of histone H3 lysine 4 dimethylation correlates with response to adjuvant gemcitabine in Japanese pancreatic cancer patients treated with surgery. *European Journal of Surgical Oncology : The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, *38*(11), 1051–1057. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2012.08.008>
- Weber, C. M., & Henikoff, S. (2014). Histone variants_dynamic punctuation in transcription_Weber_Henikoff_GenDev_2014_review.p.pdf, 672–682. <https://doi.org/10.1101/gad.238873.114.Freely>
- Wei, Y., Xia, W., Zhang, Z., Liu, J., Wang, H., Adsay, N. V., ... Hung, M.-C. (2008). Loss of trimethylation at lysine 27 of histone H3 is a predictor of poor outcome in breast, ovarian, and pancreatic cancers. *Molecular Carcinogenesis*, *47*(9), 701–706. <https://doi.org/10.1002/mc.20413>
- Wörmann, S. M., & Algül, H. (2013). Risk factors and therapeutic targets in pancreatic cancer. *Frontiers in Oncology*, *3*, 282. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00282>
- Yang, H. D., Kim, P.-J., Eun, J. W., Shen, Q., Kim, H. S., Shin, W. C., ... Nam, S. W. (2016). Oncogenic potential of histone-variant H2A.Z.1 and its regulatory role in cell cycle and epithelial-mesenchymal transition in liver cancer. *Oncotarget*, *7*(10). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7194>

Zhou, H., Qin, Y., Ji, S., Ling, J., Fu, J., Zhuang, Z., ... Chiao, P. J. (2018). SOX9 activity is induced by oncogenic Kras to affect MDC1 and MCMs expression in pancreatic cancer. *Oncogene*, *37*(7), 912–923. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.393>

Zink, L.-M., & Hake, S. B. (2016). Histone variants: nuclear function and disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, *37*, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.12.002>

ANEXOS

ANEXO 1

Alineamiento de la secuencia del inserto F-1500 con la secuencia del extremo 5' del gen de la variante de histona H2A.Z.2 reportada en la base de datos Pubmed	
F-1500 NC_000007.14	CTGGGAGTTA TCCTCCAAAT TTTAACCTAA TGATGTAA GCAAAATAAA CACTGAAG AGGTTGAGAA AAGAAAAACG CTGGGAGTTA TCCTCCAAAT TTTAACCTAA TGATGTAA GCAAAATAAA CACTGAAG AGGTTGAGAA AAGAAAAACG
F-1500 NC_000007.14	GCTCACAACA GTCTGAGCTC TGTGAGGTCT GCAAATGTA TTAGGCCTAG AGGGACATGA GTATGGGACT TCGGTTATGC GCTCACAACA GTCTGAGCTC TGTGAGGTCT GCAAATGTA TTAGGCCTAG AGGGACATGA GTATGGGACT TCGGTTATGC
F-1500 NC_000007.14	CCACCTCTG CCCCACATA CACACATACC CAATCCCATG CATAACCAAT TGTTTAAAGT CATTTCATTC CTGACTATCG CCACCTCTG CCCCACATA CACACATACC CAATCCCATG CATAACCAAT TGTTTAAAGT CATTTCATTC CTGACTATCG
F-1500 NC_000007.14	GCCTCATCCA TTACCTTTTT TTTTATTATT ATTTTTTAGA CAGGGTATAT TCTGTCTCCC AAGCTGGAGT GCAGTGGTGC GCCTCATCCA TTACCTTTTT TTTTATTATT ATTTTTTAGA CAGGGTATAT TCTGTCTCCC AAGCTGGAGT GCAGTGGTGC
F-1500 NC_000007.14	GATCATGACT CACTGCAGCC TCGACCTCCT GGGCTCAAGA GATCCTCCTG TCTCAGTCTT GACAGTAGGT GAGGCTACAG GATCATGACT CACTGCAGCC TCGACCTCCT GGGCTCAAGA GATCCTCCTG TCTCAGTCTT GACAGTAGGT GAGGCTACAG
F-1500 NC_000007.14	GTTTCGCGCA CCAAGCCGGC CCCATTATCT TCGTGTCTT AGAATTTGTA ATACATGCCG GGCAGCGGTGG CTCACGCCTG GTTTCGCGCA CCAAGCCGGC CCCATTATCT TCGTGTCTT AGAATTTGTA ATACATGCCG GGCAGCGGTGG CTCACGCCTG
F-1500 NC_000007.14	TAATCCAGT ACTTTGGGAG GCAAAGGGGG GCAGATCACC TGAGGTCAGG AGTTCGAGAC CAGCCTGACC AACACGGAGA TAATCCAGT ACTTTGGGAG GCAAAGGGGG GCAGATCACC TGAGGTCAGG AGTTCGAGAC CAGCCTGACC AACACGGAGA
F-1500 NC_000007.14	AACCCCGTCT CTATTAATAA TACAAAAGTT AGCTGGGCAT TGGGGCGCGC GCCTGTAGTC CCAGGACTCC ATCTCTAAAA AACCCCGTCT CTATTAATAA TACAAAAGTT AGCTGGGCAT TGGGGCGCGC GCCTGTAGTC CCAGGACTCC ATCTCTAAAA
F-1500 NC_000007.14	AAGGAAAAAG AATTTGTCAT ACAAATAACA ATATGTAGCC AATTGATAGC TTTTGTTTT GTTTGTTTT TTTGAGACGA AAGGAAAAAG AATTTGTCAT ACAAATAACA ATATGTAGCC AATTGATAGC TTTTGTTTT GTTTGTTTT TTTGAGACGA
F-1500 NC_000007.14	TGCGTCGCC AGCTGGAGTG CAGTGGCGCG ATCTCGGCTC ACTGCAACCT CCGCCTCCGG GGTTCAGCG ATTCTCCCGC TGCGTCGCC AGCTGGAGTG CAGTGGCGCG ATCTCGGCTC ACTGCAACCT CCGCCTCCGG GGTTCAGCG ATTCTCCCGC
F-1500 NC_000007.14	CTCAGCCTGC CGCGGACCTT GTCAGGGTCC GCGCTGAGAG GACGTCAGGG TAGTCAGTCC GCCAGAATAC GGCTGAGCAT CTCAGCCTGC CGCGGACCTT GTCAGGGTCC GCGCTGAGAG GACGTCAGGG TAGTCAGTCC GCCAGAATAC GGCTGAGCAT
F-1500 NC_000007.14	GAGGCCTGCC TAACCTTGAA ACCCAGCGCC CTCCTGATCC ACACGTTCTA AGACGAATAA ATCCTCACAG TCTGTGAAAA GAGGCCTGCC TAACCTTGAA ACCCAGCGCC CTCCTGATCC ACACGTTCTA AGACGAATAA ATCCTCACAG TCTGTGAAAA
F-1500 NC_000007.14	CCCACCAGGA GAAGCAGTC CAACACTCTT TACCTCCCA AACACAGTC TGTGAAAACC CACCAGGAGA AGCAGGTCCA CCCACCAGGA GAAGCAGTC CAACACTCTT TACCTCCCA AACACAGTC TGTGAAAACC CACCAGGAGA AGCAGGTCCA
F-1500 NC_000007.14	ACACTCTTAC CTCCCAAAC AAGTCTCAGA AGCGGGAAA ACCAACGCCG CGAATGGGCG GGAAAGCCAC AGCGCCTGCA ACACTCTTAC CTCCCAAAC AAGTCTCAGA AGCGGGAAA ACCAACGCCG CGAATGGGCG GGAAAGCCAC AGCGCCTGCA
F-1500 NC_000007.14	ATCGCTTAC CTTATTAGCT AATTTGCTG TCCTTCCAG TGGCCCGCT CCCTTGCTCG CGGGCGATAT TTTTATTGGC ATCGCTTAC CTTATTAGCT AATTTGCTG TCCTTCCAG TGGCCCGCT CCCTTGCTCG CGGGCGATAT TTTTATTGGC
F-1500 NC_000007.14	TTTCGTCTGC GAGGCGTCCA ATCTATTGG TTTGCCTTC TGTTCTGTCAG GCTTGGGCGC CTGGTAAAAG GCAGAGAGCG TTTCGTCTGC GAGGCGTCCA ATCTATTGG TTTGCCTTC TGTTCTGTCAG GCTTGGGCGC CTGGTAAAAG GCAGAGAGCG
F-1500 NC_000007.14	CGTCACTATT GGGGCTGGAG GCCCCGCTC CGCGTGCCGT GTGCAAAAAC AACAGCCGT TAGGAAGGCG GTGCCGGGGG CGTCACTATT GGGGCTGGAG GCCCCGCTC CGCGTGCCGT GTGCAAAAAC AACAGCCGT TAGGAAGGCG GTGCCGGGGG
F-1500 NC_000007.14	GGCGGGGTCT GGCTAGAAGG AGGCGCGCGA TTGAACAGCC GCTGGGGTTC GAACCAGCAA GACAAGCGGG CATTGGCCAC GGCGGGGTCT GGCTAGAAGG AGGCGCGCGA TTGAACAGCC GCTGGGGTTC GAACCAGCAA GACAAGCGGG CATTGGCCAC
F-1500 NC_000007.14	AGCAGCGCGA GCGGGCACG GGGTA TTGTCGGCT CCGGCG AGCAGCGCGA GCGGGCACG GGGTA TTGTCGGCT CCGGCG

ANEXO 2

Alineamiento de la secuencia del inserto F-1000 con la secuencia del extremo 5' del gen de la variante de histona H2A.Z.2 reportada en la base de datos Pubmed	
F-1000 NC_000007.14	GGG GCAGATCACC TGAGGTCAGG AGTTCGAGAC CAGCCTGACC AACACGGAGA GGG GCAGATCACC TGAGGTCAGG AGTTCGAGAC CAGCCTGACC AACACGGAGA
F-1000 NC_000007.14	AACCCCGTCT CTATTAATAA TACAAAAGTT AGCTGGGCAT TGGGGCGCGC GCCTGTAGTC CCAGGACTCC ATCTCTAAAA AACCCCGTCT CTATTAATAA TACAAAAGTT AGCTGGGCAT TGGGGCGCGC GCCTGTAGTC CCAGGACTCC ATCTCTAAAA
F-1000 NC_000007.14	AAGGAAAAG AATTTGTCAT ACAATAACA ATATGTAGCC AATTGATAGC TTTTGTTTT GTTTGTTTGT TTTGAGACGA AAGGAAAAG AATTTGTCAT ACAATAACA ATATGTAGCC AATTGATAGC TTTTGTTTT GTTTGTTTGT TTTGAGACGA
F-1000 NC_000007.14	TGCGTCGCCC AGCTGGAGTG CAGTGGCGCG ATCTCGGCTC ACTGCAACCT CCGCCTCCGG GGTTC AAGCG ATTCTCCCGC TGCGTCGCCC AGCTGGAGTG CAGTGGCGCG ATCTCGGCTC ACTGCAACCT CCGCCTCCGG GGTTC AAGCG ATTCTCCCGC
F-1000 NC_000007.14	CTCAGCCTGC CGCGGACCTT GTCAGGGTCC GCGCTGAGAG GACGTCAGGG TAGTCAGTCC GCCAGAATAC GGCTGAGCAT CTCAGCCTGC CGCGGACCTT GTCAGGGTCC GCGCTGAGAG GACGTCAGGG TAGTCAGTCC GCCAGAATAC GGCTGAGCAT
F-1000 NC_000007.14	GAGGCCTGCC TAACCTGAA ACCCAGCGCC CTCTGATCC ACACGTTCTA AGACGAATAA ATCCTCACAG TCTGTGAAAA GAGGCCTGCC TAACCTGAA ACCCAGCGCC CTCTGATCC ACACGTTCTA AGACGAATAA ATCCTCACAG TCTGTGAAAA
F-1000 NC_000007.14	CCCACCAGGA GAAGCACGTC CAACACTCTT TACCTCCCA AACAAACAGTC TGTGAAAACC CACCAGGAGA AGCACGTCCA CCCACCAGGA GAAGCACGTC CAACACTCTT TACCTCCCA AACAAACAGTC TGTGAAAACC CACCAGGAGA AGCACGTCCA
F-1000 NC_000007.14	ACACTTTTAC CTCCCAAAC AAGTCTCAGA AGCGGGAAA ACCAACGCCG CGAATGGGCG GGAAAGCCAC AGCGCCTGCA ACACTTTTAC CTCCCAAAC AAGTCTCAGA AGCGGGAAA ACCAACGCCG CGAATGGGCG GGAAAGCCAC AGCGCCTGCA
F-1000 NC_000007.14	ATCGCTTAC CTTATTAGCT AATTTGCTG TCCTTCCAG TGGCCCGCCT CCCTTGCTCG CGGGCGATAT TTTTATTGGC ATCGCTTAC CTTATTAGCT AATTTGCTG TCCTTCCAG TGGCCCGCCT CCCTTGCTCG CGGGCGATAT TTTTATTGGC
F-1000 NC_000007.14	TTTCGTCTGC GAGGCGTCCA ATCTCATTGG TTTGCCTTC TGTTTCGTAG GCTTGGGCGC CTGGTGAAAG GCAGAGAGCG TTTCGTCTGC GAGGCGTCCA ATCTCATTGG TTTGCCTTC TGTTTCGTAG GCTTGGGCGC CTGGTGAAAG GCAGAGAGCG
F-1000 NC_000007.14	CGTCACTATT GGGGCTGGAG GCCCCGCCTC CGCGTGCCGT GTGCAAAAAC AACAGCCGT TAGGAAGGCG GTGCCGGGGG CGTCACTATT GGGGCTGGAG GCCCCGCCTC CGCGTGCCGT GTGCAAAAAC AACAGCCGT TAGGAAGGCG GTGCCGGGGG
F-1000 NC_000007.14	GGCGGGTCT GGCTAGAAGG AGGCGCGCGA TTGAACAGCC GCTGGGGTTC GAACCAGCAA GACAAGCGGG CATTGGCCAC GGCGGGTCT GGCTAGAAGG AGGCGCGCGA TTGAACAGCC GCTGGGGTTC GAACCAGCAA GACAAGCGGG CATTGGCCAC
F-1000 NC_000007.14	AGCAGCGCGA GCGGGCAGC GGGTA TTGTCCGGCT CCGGCG AGCAGCGCGA GCGGGCAGC GGGTA TTGTCCGGCT CCGGCG

Alineamiento de la secuencia del inserto F-500 con la secuencia del extremo 5' del gen de la variante de histona H2A.Z.2 reportada en la base de datos Pubmed	
<i>F-500</i> NC_000007.14	GTCTCAGA AGCGGGAAA ACCAACGCCG CGAATGGGCG GAAAGCCAC AGCGCCTGCA GTCTCAGA AGCGGGAAA ACCAACGCCG CGAATGGGCG GAAAGCCAC AGCGCCTGCA
<i>F-500</i> NC_000007.14	ATCGCTTAC CTTATTAGCT AATTTTGCTG TCCTTCCCAG TGGCCCGCCT CCCTTGCTCG CGGGCGATAT TTTTATTGGC ATCGCTTAC CTTATTAGCT AATTTTGCTG TCCTTCCCAG TGGCCCGCCT CCCTTGCTCG CGGGCGATAT TTTTATTGGC
<i>F-500</i> NC_000007.14	TTTCGTCTGC GAGGCGTCCA ATCTCATTGG TTTGCCTTTC TGTTCTGTCAG GCTTGGGCGC CTGGTGAAAG GCAGAGAGCG TTTCGTCTGC GAGGCGTCCA ATCTCATTGG TTTGCCTTTC TGTTCTGTCAG GCTTGGGCGC CTGGTGAAAG GCAGAGAGCG
<i>F-500</i> NC_000007.14	CGTCACTATT GGGGCTGGAG GCCCCGCCTC CGCGTGCCGT GTGCAAAAAC AACAGCCGT TAGGAAGGCG GTGCCGGGGG CGTCACTATT GGGGCTGGAG GCCCCGCCTC CGCGTGCCGT GTGCAAAAAC AACAGCCGT TAGGAAGGCG GTGCCGGGGG
<i>F-500</i> NC_000007.14	GCGGGGTCT GGCTAGAAGG AGGCGCGCGA TTGAACAGCC GCTGGGGTTC GAACCAGCAA GACAAGCGGG CATTGGCCAC GCGGGGTCT GGCTAGAAGG AGGCGCGCGA TTGAACAGCC GCTGGGGTTC GAACCAGCAA GACAAGCGGG CATTGGCCAC
<i>F-500</i> NC_000007.14	AGCAGCGCGA GCGGGCAGC GGGTA TTGTCCGGCT CCGGCG AGCAGCGCGA GCGGGCAGC GGGTA TTGTCCGGCT CCGGCG

Alineamiento de la secuencia del inserto F-250 con la secuencia del extremo 5' del gen de la variante de histona H2A.Z.2 reportada en la base de datos Pubmed	
<i>F-250</i> NC_000007.14	GC GAGGCGTCCA ATCTCATTGG TTTGCCTTTC TGTTCTGTCAG GCTTGGGCGC CTGGTGAAAG GCAGAGAGCG GC GAGGCGTCCA ATCTCATTGG TTTGCCTTTC TGTTCTGTCAG GCTTGGGCGC CTGGTGAAAG GCAGAGAGCG
<i>F-250</i> NC_000007.14	CGTCACTATT GGGGCTGGAG GCCCCGCCTC CGCGTGCCGT GTGCAAAAAC AACAGCCGT TAGGAAGGCG GTGCCGGGGG CGTCACTATT GGGGCTGGAG GCCCCGCCTC CGCGTGCCGT GTGCAAAAAC AACAGCCGT TAGGAAGGCG GTGCCGGGGG
<i>F-250</i> NC_000007.14	GCGGGGTCT GGCTAGAAGG AGGCGCGCGA TTGAACAGCC GCTGGGGTTC GAACCAGCAA GACAAGCGGG CATTGGCCAC GCGGGGTCT GGCTAGAAGG AGGCGCGCGA TTGAACAGCC GCTGGGGTTC GAACCAGCAA GACAAGCGGG CATTGGCCAC
<i>F-250</i> NC_000007.14	AGCAGCGCGA GCGGGCAGC GGGTA TTGTCCGGCT CCGGCG AGCAGCGCGA GCGGGCAGC GGGTA TTGTCCGGCT CCGGCG

Alineamiento de la secuencia del inserto F-200 con la secuencia del extremo 5' del gen de la variante de histona H2A.Z.2 reportada en la base de datos Pubmed	
<i>F-200</i> NC_000007.14	GTCCTATT GGGGCTGGAG GCCCCGCCTC CGCGTGCCGT GTGCAAAAAC AACAGCCGT TAGGAAGGCG GTGCCGGGGG GTCCTATT GGGGCTGGAG GCCCCGCCTC CGCGTGCCGT GTGCAAAAAC AACAGCCGT TAGGAAGGCG GTGCCGGGGG
<i>F-200</i> NC_000007.14	GCGGGGTCT GGCTAGAAGG AGGCGCGCGA TTGAACAGCC GCTGGGGTTC GAACCAGCAA GACAAGCGGG CATTGGCCAC GCGGGGTCT GGCTAGAAGG AGGCGCGCGA TTGAACAGCC GCTGGGGTTC GAACCAGCAA GACAAGCGGG CATTGGCCAC
<i>F-200</i> NC_000007.14	AGCAGCGCGA GCGGGCAGC GGGTA TTGTCCGGCT CCGGCG AGCAGCGCGA GCGGGCAGC GGGTA TTGTCCGGCT CCGGCG

Alineamiento de la secuencia del inserto F-113 con la secuencia del extremo 5' del gen de la variante de histona H2A.Z.2 reportada en la base de datos Pubmed	
<i>F-113</i> NC_000007.14	CT GGCTAGAAGG AGGCGCGCGA TTGAACAGCC GCTGGGGTTC GAACCAGCAA GACAAGCGGG CATTGGCCAC CT GGCTAGAAGG AGGCGCGCGA TTGAACAGCC GCTGGGGTTC GAACCAGCAA GACAAGCGGG CATTGGCCAC
<i>F-113</i> NC_000007.14	AGCAGCGCGA GCGGGCAGC GGGTA TTGTCCGGCT CCGGCG AGCAGCGCGA GCGGGCAGC GGGTA TTGTCCGGCT CCGGCG

Alineamiento de la secuencia del inserto F-1221 con la secuencia del extremo 5' del gen de la variante de histona H2A.Z.2 reportada en la base de datos Pubmed	
F-1221 NC_000007.14	CTGGGAGTTA TCCTCCAAAT TTTAACCTAA TGATGTAA GCAAAATAAA CACTGAAG AGGTTGAGAA AAGAAAAACG CTGGGAGTTA TCCTCCAAAT TTTAACCTAA TGATGTAA GCAAAATAAA CACTGAAG AGGTTGAGAA AAGAAAAACG
F-1221 NC_000007.14	GCTCACAACA GTCTGAGCTC TGTGAGGTCT GCAAATGTA TTAGGCCTAG AGGGACATGA GTATGGGACT TCGGTTATGC GCTCACAACA GTCTGAGCTC TGTGAGGTCT GCAAATGTA TTAGGCCTAG AGGGACATGA GTATGGGACT TCGGTTATGC
F-1221 NC_000007.14	CCACCTCTG CCCCACATA CACACATACC CAATCCCATG CATAACCAAT TGTTAAAGT CATTTCATTC CTGACTATCG CCACCTCTG CCCCACATA CACACATACC CAATCCCATG CATAACCAAT TGTTAAAGT CATTTCATTC CTGACTATCG
F-1221 NC_000007.14	GCCTCATCCA TTACCTTTTT TTTTATTATT ATTTTTTAGA CAGGGTATAT TCTGTCTCCC AAGCTGGAGT GCAGTGGTGC GCCTCATCCA TTACCTTTTT TTTTATTATT ATTTTTTAGA CAGGGTATAT TCTGTCTCCC AAGCTGGAGT GCAGTGGTGC
F-1221 NC_000007.14	GATCATGACT CACTGCAGCC TCGACCTCT GGGCTCAAGA GATCCTCTG TCTCAGTCTT GACAGTAGGT GAGGCTACAG GATCATGACT CACTGCAGCC TCGACCTCT GGGCTCAAGA GATCCTCTG TCTCAGTCTT GACAGTAGGT GAGGCTACAG
F-1221 NC_000007.14	GTTGCGCCA CCAAGCCGGC CCCATTATCT TCGTGTCTT AGAATTTGTA ATACATGCCG GGCAGGGTGG CTCACGCTG GTTGCGCCA CCAAGCCGGC CCCATTATCT TCGTGTCTT AGAATTTGTA ATACATGCCG GGCAGGGTGG CTCACGCTG
F-1500 NC_000007.14	TAATCCAGT ACTTTGGGAG GCAAAGGGGG GCAGATCACC TGAGGTCAGG AGTTCGAGAC CAGCTGACC AACACGGAGA TAATCCAGT ACTTTGGGAG GCAAAGGGGG GCAGATCACC TGAGGTCAGG AGTTCGAGAC CAGCTGACC AACACGGAGA
F-1221 NC_000007.14	AACCCCGTCT CTATTAATAA TACAAAAGTT AGCTGGGCAT TGGGGCGCGC GCCTGTAGTC CCAGGACTCC ATCTCTAAAA AACCCCGTCT CTATTAATAA TACAAAAGTT AGCTGGGCAT TGGGGCGCGC GCCTGTAGTC CCAGGACTCC ATCTCTAAAA
F-1221 NC_000007.14	AAGGAAAAAG AATTTGTCAT ACAATAACA ATATGTAGCC AATTGATAGC TTTTGTTTT GTTTGTTGT TTTGAGACGA AAGGAAAAAG AATTTGTCAT ACAATAACA ATATGTAGCC AATTGATAGC TTTTGTTTT GTTTGTTGT TTTGAGACGA
F-1221 NC_000007.14	TGCGTCGCC AGCTGGAGTG CAGTGGCGC ATCTCGGCTC ACTGCAACCT CCGCTCCGG GGTCAAGCG ATTCTCCCGC TGCGTCGCC AGCTGGAGTG CAGTGGCGC ATCTCGGCTC ACTGCAACCT CCGCTCCGG GGTCAAGCG ATTCTCCCGC
F-1221 NC_000007.14	CTCAGCTGC CGCGGACCTT GTCAGGGTCC GCGCTGAGAG GACGTCAGGG TAGTCAGTCC GCCAGAATAC GGCTGAGCAT CTCAGCTGC CGCGGACCTT GTCAGGGTCC GCGCTGAGAG GACGTCAGGG TAGTCAGTCC GCCAGAATAC GGCTGAGCAT
F-1221 NC_000007.14	GAGGCTGCC TAACCTGAA ACCCAGCGCC CTCTGATCC ACACGTTCTA AGACGAATAA ATCCTCACAG TCTGTGAAAA GAGGCTGCC TAACCTGAA ACCCAGCGCC CTCTGATCC ACACGTTCTA AGACGAATAA ATCCTCACAG TCTGTGAAAA
F-1221 NC_000007.14	CCCACCAGGA GAAGCACGTC CAACACTCTT TACCTCCCA AACAACAGTC TGTGAAAACC CACCAGGAGA AGCACGTCCA CCCACCAGGA GAAGCACGTC CAACACTCTT TACCTCCCA AACAACAGTC TGTGAAAACC CACCAGGAGA AGCACGTCCA
F-1221 NC_000007.14	ACACTTTTAC CTCCCAAAC AAGTCTCAGA AGCGGGAAA ACCAACGCCG CGAATGGGCG GGAAAGCCAC AGCGCTGCA ACACTTTTAC CTCCCAAAC AAGTCTCAGA AGCGGGAAA ACCAACGCCG CGAATGGGCG GGAAAGCCAC AGCGCTGCA
F-1221 NC_000007.14	ATCGCTTAC CTTATTAGCT AATTTGCTG TCCTCCAG TGGCCCGCT CCCTGCTCG CGGGCGATAT TTTTATTGGC ATCGCTTAC CTTATTAGCT AATTTGCTG TCCTCCAG TGGCCCGCT CCCTGCTCG CGGGCGATAT TTTTATTGGC
F-1221 NC_000007.14	TTTCGTCTGC GAGGCGTCCA ATCTATTGG TTTGCCTTC TGTTCTGTCAG GCTTGGGCGC CTGGTAAAAG GCAGAGAGCG TTTCGTCTGC GAGGCGTCCA ATCTATTGG TTTGCCTTC TGTTCTGTCAG GCTTGGGCGC CTGGTAAAAG GCAGAGAGCG

ANEXO 3

Alineamiento de la secuencia del inserto F-735 SOX MUT con la secuencia del extremo 5' del gen de la variante de histona H2A.Z.2 reportada en la base de datos Pubmed. Tres bases de tres sitios de unión para los FTs SOX fueron modificadas (están resaltadas en negritas)	
F-735 NC_000007.14	GC TT CCTTTTCCT TTGT CCT T TTTGAGACGA GC TTTTGTTTT GTTTGTTTGT TTTGAGACGA
F-735 NC_000007.14	TGCGTCGCCC AGCTGGAGTG CAGTGGCGCG ATCTCGGCTC ACTGCAACCT CCGCCTCCGG GGTTC AAGCG ATTCTCCCGC TGCGTCGCCC AGCTGGAGTG CAGTGGCGCG ATCTCGGCTC ACTGCAACCT CCGCCTCCGG GGTTC AAGCG ATTCTCCCGC
F-735 NC_000007.14	CTCAGCCTGC CGCGGACCTT GTCAGGGTCC GCGCTGAGAG GACGTCAGGG TAGTCAGTCC GCCAGAATAC GGCTGAGCAT CTCAGCCTGC CGCGGACCTT GTCAGGGTCC GCGCTGAGAG GACGTCAGGG TAGTCAGTCC GCCAGAATAC GGCTGAGCAT
F-735 NC_000007.14	GAGGCCTGCC TAACCTTGAA ACCCAGCGCC CTCCTGATCC ACACGTTCTA AGACGAATAA ATCCTCACAG TCTGTGAAAA GAGGCCTGCC TAACCTTGAA ACCCAGCGCC CTCCTGATCC ACACGTTCTA AGACGAATAA ATCCTCACAG TCTGTGAAAA
F-735 NC_000007.14	CCCACCAGGA GAAGCACGTC CAACACTCTT TACCTCCCCA AACAACAGTC TGTGAAAACC CACCAGGAGA AGCACGTCCA CCCACCAGGA GAAGCACGTC CAACACTCTT TACCTCCCCA AACAACAGTC TGTGAAAACC CACCAGGAGA AGCACGTCCA
F-735 NC_000007.14	ACACTTTTAC CTCCTCAAAC AAGTCTCAGA AGCGGGAAA ACCAACGCCG CGAATGGGCG GGAAAGCCAC AGCGCCTGCA ACACTTTTAC CTCCTCAAAC AAGTCTCAGA AGCGGGAAA ACCAACGCCG CGAATGGGCG GGAAAGCCAC AGCGCCTGCA
F-735 NC_000007.14	ATCGCTTAC CTTATTAGCT AATTTTGCTG TCCTTCCAG TGGCCGCCT CCCTTGCTCG CGGGCGATAT TTTTATTGGC ATCGCTTAC CTTATTAGCT AATTTTGCTG TCCTTCCAG TGGCCGCCT CCCTTGCTCG CGGGCGATAT TTTTATTGGC
F-735 NC_000007.14	TTTCGTCTGC GAGGCGTCCA ATCTCATTGG TTTGCCTTC TGTTTCGTCAG GCTTGGGCGC CTGGTAAAAG GCAGAGAGCG TTTCGTCTGC GAGGCGTCCA ATCTCATTGG TTTGCCTTC TGTTTCGTCAG GCTTGGGCGC CTGGTAAAAG GCAGAGAGCG