

MANTENIMIENTO DE LA INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X: EXPLORACIÓN CON RNA-INTERFERENTE CONTRA EL GEN DE SUSCEPTIBILIDAD A CÁNCER DE MAMA (BRCA1)

X CHROMOSOME INACTIVATION MAINTENANCE: EXPLORATION WITH IN- TERFERING RNA AGAINST THE BREAST CANCER SUSCEPTIBILITY GENE (BRCA1)

Lina Marcela Barrera Arenas¹, David Aristizábal², Carlos Muskus³, Mauricio Camargo¹

¹. Grupo Genética, Regeneración y Cáncer, SIU, Universidad de Antioquia

². Hospital Universitario Vall d'Hebron Barcelona-España

³. PECET - Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia

Recibido: Julio 30 de 2015

Aceptado: Agosto 10 de 2015

*Correspondencia del autor: marcela.barrera@udea.edu.co

RESUMEN

La inactivación del cromosoma X (XCI) es un evento epigenético que suprime muchos genes en uno de los dos X en los mamíferos hembras. El mantenimiento de ese estado excepcional de herencia somática depende en parte del remodelamiento de la cromatina. Hace tres décadas publicamos la primera evidencia de la existencia de dos **Xa** en células de cáncer de mama. Y evidencias recientes involucran a la proteína BRCA1 con remodelación cromatínica. Partiendo de estas observaciones, una citogenética y otra molecular, planteamos la posible relación entre BRCA1 y XCI. Para investigarlo, se abrogó la expresión de BRCA1 en células XiXa, utilizando shRNAs contra el mRNA de la proteína BRCA1. De los clones recombinantes en DH5alpha, se extrajeron los plásmidos psiSTRIKE-Neo-shRNAs, y con ellos se lipo-transfectaron células XiXa. Mediante Western-blot se confirmó el silenciamiento de la proteína BRCA1. Con la secuencia Sh2-RNA de mayor grado de silenciamiento anti BRCA1, se encontró expresión QRT-PCR aumentada en las transfectadas, y para los genes POLA1, PGK1 y OCRL ligados a regiones que no escapan a la inactivación, y para el gen control ZFX que normalmente sí escapa a la inactivación (control interno).

En conclusión, aunque el RNAi anti-BRCA1 no afecta la metilación de promotores de los genes examinados sinténicos al X, si perturba sus niveles de expresión, sugiriendo que BRCA1 si puede afectar el estado de mantenimiento de inactivación de esos loci, lo cual no es incompatible con la postulada acción epigenética de BRCA1 sobre la remodelación de la cromatina.

Palabras claves: RNA-interferente, BRCA1, inactivación, cromosoma-X, cáncer de mama.

ABSTRACT

X chromosome inactivation (XCI) is an epigenetic event that suppresses many genes in one of the two X in female mammals. Maintenance of this exceptional state of somatic inheritance depends partly on the remodeling of chromatin. Three decades ago we published the first evidence of the existence of two Xa in breast cancer cells. And recent evidence involves the BRCA1 protein with chromatin remodeling. Based on these evidences at the molecular and cytogenetic level, we proposed a possible relationship between BRCA1 and XCI. To investigate these clues, BRCA1 expression was abrogated on XiXa cells using shRNAs against the mRNA of the BRCA1 protein. From the DH5alpha recombinant clones, psiSTRIKE-Neo-shRNAs plasmids were extracted, and used to lipo-transfect XiXa cells. Silencing of the BRCA1 protein was confirmed by Western blot. With the Sh2-RNA that generated the greater degree of silencing, through QRT-PCR in transfected cells we found increased expression of POLA1, PGK1 and OCRL genes linked to regions of the Xi that do not scape inactivation, and for the ZFX gene which normally escapes inactivation (internal control).

In conclusion, and although the anti-BRCA1 RNA is employed did not affect the epigenetic methylation state of X-linked genes examined, it does perturb their expression levels, suggesting that BRCA1 could affect the state of inactivation of those Xi-linked loci, which is compatible with the postulated epigenetic action of BRCA1 on chromatin remodeling.

Keywords: interfering-RNA, BRCA1, inactivation, X-chromosome, breast cancer

INTRODUCCIÓN

Hace tres décadas publicamos la primera evidencia de la existencia de dos cromosomas X activos (Xa) en células de cáncer de mama (1). Y solo recientemente se está empezando a descubrir la biología molecular de este importante fenómeno biológico epigenético, aparentemente ligado a la carcinogénesis mamaria. La inactivación del cromosoma X (XCI), resulta en la represión epigenética transcripcional de la mayoría de genes en uno de los dos cromosomas X en las hembras de los mamíferos. Al parecer, este mecanismo compensa en parte, el desbalance de dosis que originaría la diferencia en la constitución genética de machos XY y hembras XX. Ocurre en el blastocisto, en donde uno de los cromosomas X, es inactivado aleatoriamente y se mantendrá clonalmente inactivo en todas las generaciones celulares subsecuentes, generando un mosaicismo epigenético constituido por células con patrones opuestos de XCI (2-5).

El proceso de inactivación, que ha sido extensamente estudiado y revisado (6,7), se divide en tres etapas generales que son: **la iniciación, el establecimiento y el mantenimiento** del silenciamiento. Durante la **iniciación** se activan dos procesos: Uno de ellos es el **conteo**, mediante el cual se silencian aleatoriamente todos los cromosomas X menos uno. En sucesión, se presenta la **escogencia** del cromosoma que se va a inactivar. Al res-

pecto, estudios recientes sugieren que en las etapas previas a la inactivación ambos cromosomas alternan entre dos estados de “inactivación-activación” parcial que le confiere a cada cromosoma X una probabilidad independiente de iniciar la inactivación (4, 8). Al parecer, durante esta transición de conteo-escogencia hay acumulación de transcritos de *Xist* cuya estabilización concurre en el futuro Xi. El RNA *Tsix* también parece estar implicado en los procesos iniciales de conteo-escogencia, en los cuales los centros de inactivación (Xic's) de los cromosomas X colocalizan transitoriamente (9,10).

El **establecimiento** de la XIC comienza una vez el RNA *Xist* cubre el X que será inactivado, y factores epigenéticos concurren para el mantenimiento del estado inactivo, induciendo una cascada de eventos remodeladores de la cromatina que silencian el Xi en *cis* de manera permanente. Estas modificaciones son promovidas por la interacción de HDACs, metiltransferasas y proteínas remodeladoras de la cromatina (11). En este caso, el Xi es enriquecido por modificaciones de histonas como la metilación de la histona 3 en el residuo de lisina 9 (H3-K9) que es uno de los eventos de remodelación más tempranos que caracterizan esta cascada. Posteriormente un grupo de proteínas (*polycomb*) Eed/Enx1 se asocian a dicho cromosoma de manera transitoria y son las responsables de la metilación temprana de la H3 en el residuo de la lisina 27 (H3K27). Este proce-

so es seguido rápidamente por otras modificaciones de histonas como la metilación de la histona 4 en la lisina 20 (H4K20), la ubiquitinación de la histona 2A (H2A), hipacetilación de H4 y la hipometilación de la histona 3 en la lisina 4 (H3K4) (3, 12), que llevan al silenciamiento transcripcional y a la replicación tardía. En este punto, el estado inactivo se termina de consolidar con el reclutamiento de la variante macroH2A, y la metilación del DNA en las islas CpG de regiones promotoras (12). Una vez establecido el silenciamiento, éste es de carácter heredable y se mantiene a través de la replicación tardía en la fase S, marca clásica de la heterocromatina facultativa Xi.

Para explicar el **mantenimiento** de la inactivación durante el curso del ciclo celular se ha propuesto el siguiente modelo: Durante la porción media-tardía de la fase G1, la asociación de HP1 con el Xi, promueve la formación de heterocromatina de alto orden de compactamiento. El RNA *Xist* facilita el reclutamiento de la histona macroH2A, lo que impide el acceso al Xi de factores de transcripción y/o remodeladores de la cromatina. En este punto la heterocromatina es muy estable y compacta, formando el llamado **Corpúsculo de Barr**. Durante la entrada y el transcurso temprano de la fase S, la histona H1 pierde afinidad por el DNA y se disocia del Xi, debido a que es fosforilada por una Cdk. Esto permite que las proteínas de unión a la cromatina HMG-I/Y (High Mobility Group), se asocien al Xi y se promueva una configuración abierta de la cromatina, facilitando sucesivamente su remodelación, mediada posiblemente por **BRCA1**, contrarrestando los efectos de la histona macroH2A. Esta configuración hace posible entonces la replicación del DNA, los nucleosomas retienen su estado de metilación, y se segregan aleatoriamente entre las cadenas recién sintetizadas. A su vez, los nucleosomas que se incorporan *de novo* para las hebras nacientes se componen de tetrámeros acetilados (H3-H4)₂. La presencia del RNA *Xist* en el Xi a través del proceso de replicación, asegura el reclutamiento de los dímeros de macroH2A-H2B. Acto seguido, las DNMTs, más específicamente DNMT1, reconocen y metilan el DNA hemimetilado, y en combinación con los nucleosomas metilados, reclutan complejos de HDAC/HMTasa que deacetilan y subsecuentemente metilan los nucleosomas que se van incorporando. Luego, durante la transición de la fase S tardía a G2 temprana, HMG I/Y es fosforilada por la misma Cdk que fosforila a H1 (con una ciclina diferente), y se disocia del Xi. Durante este período, HP1 también se disocia del Xi, y una vez la célula entra en mitosis, también se disocia el RNA

Xist (13). Ya en G1 la heterocromatina del Xi se reestablece, *Xist* reconoce a macroH2A, la cual se mantiene asociada al Xi durante la mitosis, HP1 se une de nuevo a la H3 metilada, y H1 se une al DNA internucleosomal, y así, este conjunto de proteínas e interacciones promueven la reconstitución de la heterocromatina de alto orden, característica del Xi.

De otro lado, cabe recordar que durante el proceso normal de la XCI, hay genes que **escapan al silenciamiento génico** y se expresan en ambos X. El grado de escape al estado activo puede variar entre loci, en un amplio rango (5-75%) relativo al Xa, heterogeneidad atribuida a diferentes ambientes cromatínicos moleculares en dichos genes (3, 5, 12). Uno de esos factores son los elementos LINE1, abundantes en el X humano pero ausentes en las regiones que escapan a este fenómeno. Otros son los elementos aisladores (IE) que pueden formar dominios para prevenir el esparcimiento de la heterocromatización (12, 14).

Dentro de toda esta jerarquía de remodelación, y debido a su relación con el cáncer de mama y ovario, ha despertado gran interés el papel que puede llevar a cabo la BRCA1 en la modelación de la heterocromatina del Xi inactivo. La ausencia del Xi en células XX de cáncer de mama, estableció las primeras evidencias sobre la posible alteración de la XCI en este tipo de cáncer (1). Pero fue en el año 2002, cuando Ganesan y colaboradores (15) lograron establecer un vínculo directo entre el fenómeno de la XCI y la **BRCA1**, cuando se demuestra que en células BRCA1 ^{-/-}, procedentes de carcinoma mamario humano, se pierden la replicación tardía, la metilación en la H3K9 y la localización del RNA *Xist* y macroH2A sobre el Xi. En el caso inverso, cuando se reconstituye el genotipo (+) de BRCA1, se promueve la relocalización de *Xist* y macroH2A. Este posible vínculo BRCA1-Xi, fue posteriormente reforzado por el mismo autor (16). A partir de estos resultados se propone que la disfunción en BRCA1 afecta el mantenimiento de la XCI (15). Sin embargo, no queda claro si la falla en la localización de *Xist* es la que provoca la pérdida de las marcas de inactivación. En relación a esto, si bien existen estudios en los que se muestra que la pérdida de *Xist* provoca la reactivación génica, también se ha demostrado que la delección de este RNA no afecta el mantenimiento de las marcas heterocromáticas en el Xi, y que alteraciones en la maquinaria del RNAi no son esenciales para la iniciación de la XCI (17,18). Asimismo, se ha encontrado que en sistemas inducidos para la sobreexpresión de BRCA1, se presenta una

fuerte relación con la expresión de XIST, confirmando la pérdida de un Xi en células tumorales (19,20). Además, recientemente se publicó un par de estudios que presentan evidencias contradictorias con respecto a la reproducibilidad de los hallazgos de Ganesan *et al.* por lo cual la relación entre BRCA1 y Xist permanece por definir (16, 21). Por lo tanto, y aunque todavía no es clara la relación entre BRCA1 y el fenómeno de XCI, se trata de un postulado sugestivo y fascinante, más aún cuando existen estudios en donde se ha evidenciado que la localización de BRCA1 en el Xi es mediada por una asociación a la heterocromatina pericentromérica en general y no específicamente con la heterocromatina facultativa del Xi (22) y, que sin importar la funcionalidad de BRCA1, las líneas celulares de cáncer de mama poseen alteraciones en la inactivación del X (1,11,23).

En síntesis, teniendo en cuenta: (a) el modelo de mantenimiento de la heterocromatina en el Xi, (b) las alteraciones en la inactivación del X en cáncer de mama, y (c) las relaciones existentes entre BRCA1 y factores remodeladores de la cromatina, se plantea la siguiente pregunta de investigación: *¿Está BRCA1 relacionado con el mantenimiento o inestabilidad de la inactivación del X?* En esta investigación, se acomete esta pregunta mediante la moderna metodología del RNA de interferencia (shRNAs).

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas y Cultivos Celulares.

Se utilizaron células somáticas de origen femenino (HeLa y MCF7). Se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 4mM de L-Glutamina, 1,5g/L de NaH₂CO₃, 4,5g/L de glucosa y 10% de Suero Bovino Fetal. Se subcultivaron cada 2-3 días sembrando aproximadamente 2 x 10⁵ células en 5 mL del medio suplementado.

Diseño del sistema de silenciamiento.

Para bloquear la producción de BRCA1 en las células HeLa, se inhibió la expresión del gen de dicha proteína, utilizando el mecanismo de RNA de interferencia mediado por shRNAs (small hairpin RNA). Para este efecto se utilizó el kit **siSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning System (Human) - Neo** de PROMEGA (Wisconsin, USA) el cual provee un vector de expresión de shRNAs que permite clonar secuencias de shRNAs. En este caso se introdujeron por separado secuencias de shRNAs complementarios al RNA mensajero de BRCA1 (que induce la degradación de éste). El diseño de los shRNAs se hizo a través del **siRNA Target Designer – Version 1.51** (24), el cual arrojó las secuencias blanco posibles dentro del mRNA de BRCA1. Estas se reanalizaron en el programa **mfold** (25) y se escogieron las tres con mayor energía libre y estabilidad. A partir de estas secuencias se ordenó la síntesis de los oligonucleótidos que se mencionan a continuación con sus respectivas posiciones en el mRNA de BRCA1: Sh1 (3091-3109), Sh2 (1103-1121), Sh3 (3508-32526). Todas se ubican en la porción amino terminal, la cual es muy importante para la interacción con otras proteínas y cerca de dos señales nucleares que posee BRCA1. También se empleó una secuencia control “random” (Sh4). Los oligonucleótidos fueron alineados e insertados en el vector **psiSTRIKE™ Neo**, utilizando DNA ligasa T4. El producto de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes (DH5alpha) que fueron seleccionadas en ampicilina. Luego el DNA plasmídico provenientes de 5 colonias individuales por cada shRNA se purificó utilizando Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega (Figura 1). Para verificar la inserción de la secuencia de shRNA en el vector, el plásmido se cortó con *PstI*, obteniendo los dos fragmentos esperados ya que la inserción del shRNA introduce otro sitio de corte *PstI*.

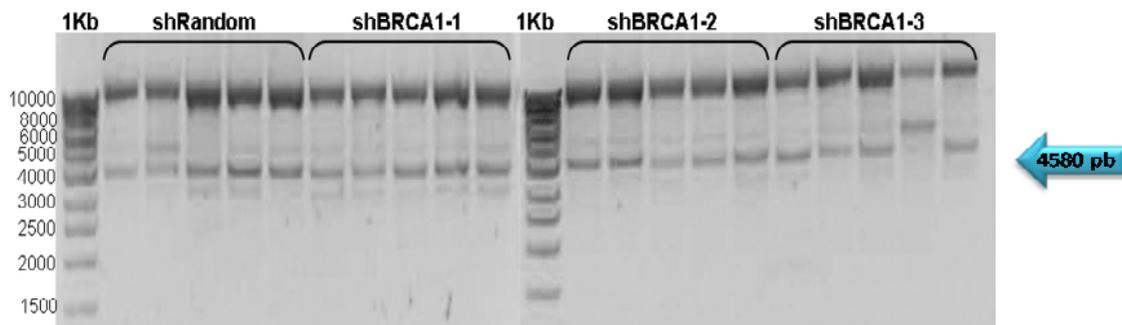


Figura 1. Extracción de plásmidos shRNAs anti-BRCA1 por MINIpip alcalina: A partir de cultivos de bacterias transformadas con los productos de ligación psiSISTRIKE + 3 secuencias de shRNAs anti-BRCA1 y una secuencia control. Se extrajeron diferentes muestras de plásmidos (provenientes de 5 colonias individuales por cada shRNA). Las diferentes bandas observadas en cada carril corresponden a diferentes conformaciones del plásmido. La flecha azul indica la ubicación del plásmido de 4580 pb aproximadamente.

Transfección del RNA de interferencia contra BRCA1.

Cada plásmido recombinante se transfectó a células HeLa utilizando lipofectamina-2000 siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de 6 horas de incubación a 37°C, se retiran los complejos Lipoflex, se hacen dos lavados con PBS 1X y se adiciona 1 mL de DMEM sin antibiótico + 10% FBS. La selección se realizó 36 horas después, utilizando una concentración de 400 ug/mL del antibiótico G418 (análogo de la Neomicina) escogida después de realizar una curva de citotoxicidad durante 12 - 15 días. Estos experimentos se realizaron por triplicado.

Evaluación de la expresión de BRCA1.

Para determinar cuál de los tres shRNA introducidos es más efectivo, la expresión de BRCA1 se evaluó por medio de Western blot, se inició a partir de homogenizados de los cultivos de células transfectadas con los plásmidos psiSTRIKE-NEO portadores de cada shRNA-anti-BRCA1, además del sh-random (shC) y seleccionadas con G418. Para ello, muestras de 1 x 10⁶ células fueron tratadas con 100 uL de buffer de lisis y 1 uL de inhibidor de proteasas; luego se cuantificaron por el método de ácido bicinonínico. Posteriormente, se corrieron (40 ug/pozo) en un gel desnaturante de poliacrilamida al 6% a 90V durante 2 h. Inmediatamente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (4h/250mA). Se bloquearon con T-TBS y leche al 5% durante 1 h a temperatura ambiente y se incubaron con el anticuerpo primario anti-BRCA1 (c-ter) (1:1000) (Cell Signaling Cat # 9010), y anti- α -tubulina (DM1A) (1:1000) (Cell Signaling Cat # 3873) a 4°C durante toda la noche. Después de los lavados convencionales, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario Anti-IgG (anti-rabbit) conjugado con peroxidasa (1:5000), y se revelaron por quimioluminiscencia (BioRad Sytems)

colocando las membranas sobre películas autoradiográficas. Dichas películas se analizaron con densitómetro “*scanner power look*” acoplado al Chemidoc XRS system software Quantity one (Biorad).

Para evaluar los parámetros de inactivación enunciados en los numerales siguientes, se obtuvieron cultivos con una supresión de BRCA1 hasta del 55% (sh2), con respecto al control de células transfectadas con el vector solo (“mock”). Dos controles adicionales incluyeron células transfectadas con un shRNA random y células no transfectadas.

Evaluación de la expresión de genes ligados al cromosoma X (QRT-PCR).

El RNA total de las células suprimidas para BRCA1 y control, se obtuvo con TRIsure (Invitrogen, Carlsbad, CA) a los 12 - 15 días post-transfección, siguiendo las instrucciones del fabricante; luego se cuantificó mediante Nanodrop. Se procedió a la síntesis de cDNA y la Q-PCR usando el kit QuantiFast™ SYBR® Green RT-PCR (Quiagen) según las instrucciones del fabricante. Las QRT-PCR se realizaron en un termociclador Smart-cycler System (Cepheid, USA), en un volumen final de 25 uL que contenía 80 ng/uL de RNA. El perfil para realizar la RT-PCR estaba compuesto de varios pasos: 1) transcripción reversa por 10 minutos a 50°C, 2) activación inicial de la PCR por 5 minutos a 95°C, 3) ciclos: desnaturación por 10 segundos a 95°C, combinación de annealing/extensión por 30 segundos con la temperatura específica para cada par de primers durante 35 ciclos y 4) extensión final por 10 minutos a 72°C. La amplificación de cDNA se llevó a cabo con las condiciones específicas para cada par de primers (Tabla 1).

Los datos obtenidos de la RT-PCR cuantitativa fueron

Tabla 1. Primers para QRT-PCR de los genes ligados al X. ZFX es el control interno que normalmente no escapa a la inactivación porque se expresa tanto en el Xa como en el Xi.

Gen	Nombre	Secuencia	Tm °C	GC	Tam Prod
POLA 1 F	DNA polimerasa alfa	AAG CCT CCC TTT CAG TCA CA	60	50%	112 bp
POLA 1 R		CAG CAA CCT CAA CCT TCA CA	60	50%	
PGK1 F	Fosfoglicerato kinasa 1	ATG GAT GAG GTG GTG AAA GC	60	50%	118 bp
PGK1 R		CAG TGC TCA CAT GGC TGA CT	60	55%	
ZFX F	Proteína con dedos de zinc, ligada al X	ACG GCA CGT TAT TTC CAT TC	60	45%	105 bp
ZFX R		TGT CGC ATT ATG TGC TGG TT	60	45%	
OCRL F	Proteína relacionada a inositol fosfato-5-fosfatasa	TGG ACA GGT TCC CTG CCA TT	60	55%	217 bp
OCRL R		GCC TCG ATC CAG GTG AAG GA	60	60%	

analizados en el programa LinRegPCR (11.0). Las eficiencias se calcularon en el software a partir de la pendiente generada por los valores CT (Número de ciclos generados para alcanzar el umbral de fluorescencia). La ecuación 1 muestra el modelo matemático de la razón de expresión relativa en RT-PCR. La razón del gen blanco es expresado en una muestra vs un control en comparación a un gen de referencia (26).

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{3CP_{\text{target}}(\text{control}-\text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{3CP_{\text{ref}}(\text{control}-\text{sample})}}$$

Evaluación del estado de metilación de los promotores de genes ligados al X.

A partir de cultivos celulares con una confluencia del 90-95% (1×10^6 células) se realizó extracción de DNA con buffer estándar (200 mM de tris pH 7.5, 250 mM de NaCl, 25 mM de EDTA y 5% de SDS), se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol al 96%, obteniendo una concentración de ~ 800 ng/uL cuantificado con Nanodrop.

El estado de metilación de los promotores de los genes ligados al cromosoma X, *PGK1*, *POLA*, *OCRL* y *ZFX*, se analizó por PCR usando DNA genómico previamente digerido con la enzima HpaII sensible a la metilación. Nótese que los tres primeros genes están en loci del Xi que no escapan a la inactivación, mientras que *ZFX* si escapa a la inactivación y se empleó como control interno. Los “*primers*” empleados (Tabla 2) generan amplificadas que abarcan varios sitios de restricción sensibles a la metilación en 5' de cada gen.

Previo a la PCR, 2 ug de DNA genómico obtenido de la transfección y del control, se cortaron con la enzima HpaII, en un volumen final de 20 uL que contenía NE-buffer 1X, y 10U/uL de enzima. La mezcla se incubó 16 horas a 37°C y se inactivó a 65°C por 20 minutos. Por último se tomaron 2 uL del DNA digerido para hacer la PCR. Las PCR se realizaron en un termociclador PTC-200 MJ Research, Inc USA, a un volumen final de 25 uL que contenía 50 - 200 ng/uL de DNA genómico, buffer amonio para PCR 1X, MgCl₂ 1.5 mM, 0.2 mM de cada primer, 0.2 mM de cada uno de los deoxinucleótidos (dTTP, dGTP, dCTP, y dATP) y 0.03 U de *Taq* polimerasa recombinante (Bioline). La amplificación se llevó a cabo con una desnaturalización inicial de 94°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos que consistían de una desnaturalización a 94°C por 30 segundos, una temperatura de alineamiento específica para cada par de primers (Tabla 3) por 45 segundos, y una elongación a 72°C por 1 minuto. La elongación final fue de 10 minutos a 72°C. El nivel de metilación (hipo/hipermetilación) se determinó por la presencia o ausencia de cada amplificado, visualizado en gel de agarosa al 1.5%.

Análisis Estadístico.

Los datos obtenidos en el Western blot fueron tabulados, procesados, graficados y analizados estadísticamente mediante el programa GrahPad prism® 5.0 (versión para Windows). Se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las poblaciones y se aplicó ANOVA de una sola vía para diferencia de medias entre células BRCA1-suprimidas y sus respectivos controles. Los valores $p < 0.05$ se consideraron significativos.

El análisis de los resultados se basó fundamentalmente

Tabla 2. Primers específicos para regiones promotoras (ensayo de metilación).

Nombre	Gen	Secuencia
DNA polimerasa alfa	POLA 1 F	5'CTGGGGAAAACGATCCAACC3'
	POLA 1 R	5'CTGAAAGCCAATCAGCGGC3'
Fosfoglicerato kinasa 1	PGK1 F	5'ACGCGGCTGCTCTGGGC3'
	PGK1 R	5'TTAGGGGCGGAGCAGGAAG3'
Proteína con dedos de zinc, ligada al X	ZFX F	5'CTACCCTTCCGCATTTTCCT 3'
	ZFX R	5'GAGCTCGGAGCTGACAAAAA 3'
Proteína relacionada a inositol fosfato-5-fosfatasa	OCRL F	5'AGATTCTCAGCTCCCAGCT3'
	OCRL R	5'CCGATCCGACGACACTGGC3'

Tabla 3. Condiciones de temperatura y MgCl para cada par de primers específicos para las regiones promotoras (ensayo de metilación).

Gen	Tamaño del amplificado	Temperatura de anelling	Concentración de Cloruro de Magnesio
POLA	349 bp	57.4	1.5 Mm
PGK1	143 bp	59.8	1.5 mM
OCRL	129 bp	60	2.0 Mm
ZFX (Control)	105 bp	59.8	1.5 Mm

en la comparación de los niveles de expresión de los genes ligados al cromosoma X, y los niveles de metilación de sus promotores en células transfectadas o no

gura 2).

La secuencia Sh2, generó el mayor grado de silenciamiento **parcial** (55%) de la proteína, lo cual es congruente con lo esperado ya que esa región génica está ubicada exactamente dentro del exón 3 que pertenece a la región amino-terminal que permite la interacción con otras proteínas. Se trata entonces de un resultado efectivo/deseable ya que de allí parte el examen del silenciamiento de esta proteína (mediada con RNAi) sobre la replicación de ambos cromosomas X, y sobre la expresión de genes sintéticos que habitualmente escapan o no al mecanismo natural de inactivación.

Estos resultados son técnicamente congruentes con el creciente número de artículos científicos que emplean esta reciente y robusta técnica del RNAi para generar interferencia específica en la expresión de un gen en modelos celulares (27). Y en el caso de la presente investigación, se refiere a la disminución específica y significativa en la expresión de la proteína BRCA1 y evaluar las consecuencias que ello pueda generar en otros procesos celulares/moleculares asociados a la inactivación del cromosoma X.

Para obtener la disminución de la expresión de BRCA1, todas las secuencias diseñadas se ubican en la porción amino-terminal, crucial para la interacción de BRCA1 con otras proteínas. En esta región se encuentra un dominio **RING** (126 a.a.) que es un motivo relativamente pequeño de dedos de zinc, capaz de unir DNA, RNA, proteínas y ciertos lípidos, y que se asocia directamente con el RNA Xist no codificante (15).

BRCA1, a diferencia de la mayoría de genes supresores de tumor, es un gen poco conservado. Esta característica se observa principalmente en las porciones amino y carboxi terminal que coinciden con el dominio RING (amino-terminal) y BRCT (carboxi-terminal). Es precisamente en estas regiones donde se localiza el mayor número de mutaciones sin sentido, que se relacionan al cáncer de mamá, lo que indica que son regiones posiblemente involucradas en la supresión tumoral mediada

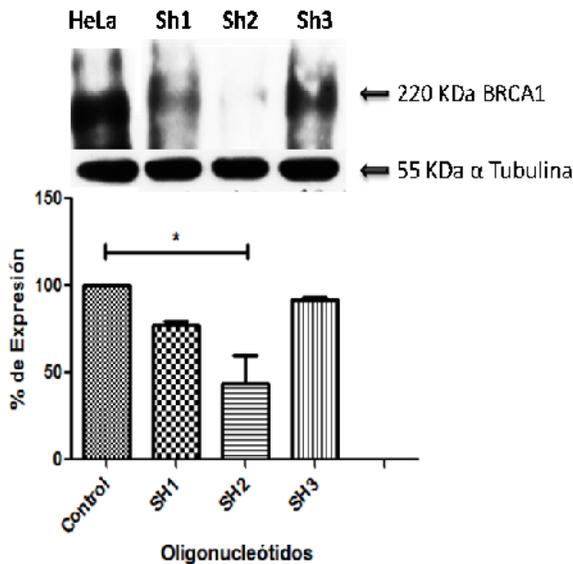


Figura 2. Evaluación de la eficiencia de silenciamiento de la proteína BRCA1 a través de las tres secuencias shRNA seleccionadas. SH1, oligonucleótido No 1; SH2, oligonucleótido No 2; SH3, oligonucleótido No 3.

transfectadas (mock) con los shRNA interferentes para BRCA1 vs shRNA aleatorio. La cuantificación estadística de estos parámetros se describe en los apartes correspondientes a cada técnica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la expresión de BRCA1 por Western blot.

De los cultivos de células transfectadas con el plásmido psiSTRIKE-NEO portador de cada shRNA-antiBRCA1, se obtuvieron homogenizados proteicos que evidenciaron un nivel de supresión del nivel de BRCA1 del 25% para Sh1, 55% para Sh2 y 15% para Sh3, con respecto al control (células transfectadas con el vector solo). Estos resultados fueron obtenidos mediante densitometría, y las diferencias estadísticas analizadas a través del estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis ($P = 0,0145$) mostraron una diferencia significativa entre el control (HeLa) y el constructo Sh2 ($P < 0.05$) (Fi-

por BRCA1 (28).

Al comparar nuestros resultados con los hallazgos de otros autores, se demuestra que la supresión de la proteína BRCA1 a través del mecanismo RNAi, es efectivo a partir de las 72 horas, sugiriendo que la pérdida de esta proteína en las células XX puede llevar a la perturbación y desestabilización del estado de silenciamiento del Xi (15, 29). Otros apoyos bibliográficos señalan que cambios en la dosis y la expresión de genes ligados al cromosoma X, se han encontrado en tumores BRCA1 -/- y en tipo BLC (20). Los datos anteriores sugieren que la pérdida de BRCA1 puede llevar a una disrupción específica de muchas de las características del Xi, incluyendo la localización normal de Xist. Dadas estas observaciones, es posible que el mantenimiento defectuoso de la inactivación del cromosoma X sea un evento que predispone a la progresión neoplásica de células epiteliales de mama y ovario.

Sin embargo, otros estudios como los de Xiao y colaboradores (21), Sirchia y colaboradores (23), indican que no existe tal relación, pues reportan que BRCA1 no se encuentra en niveles elevados en la cromatina cubierta por el RNA Xist del Xi, y que mutaciones o depleciones de BRCA1 no causan cambios significativos en la localización del RNA Xist o la expresión de los genes liga-

dos al cromosoma X, sugiriendo que BRCA1 no tiene un papel importante en la promoción de la localización del RNA Xist para el mantenimiento de la estabilidad de la heterocromatina facultativa.

De ahí nuestro interés en aplicar esta nueva tecnología del RNAi para abordar este interrogante, y documentar si la depleción de BRCA1 vía shRNA-anti-BRCA1, influye o no en marcadores epigenéticos asociados al remodelamiento de la cromatina del X inactivo.

Estado de metilación de genes ligados al cromosoma X sujetos a la XCI.

Para medir un parámetro epigenético de los genes ligados al cromosoma X en la línea celular HeLa (con/sin transfección siRNA anti-BRCA1), analizamos el estado de metilación de los promotores de tres genes de estatus de inactivación/metilación conocidos, y que la literatura consenso los ha reportado así: *POLA1*(Xp) y *PGK1*(Xq) que se inactivan en el Xi y solo se expresan a partir del Xa; y el gen *ZFX* que escapa a la inactivación y se expresa de ambos Xs. Como controles celulares se emplearon la línea celular de cáncer de mama MCF7 (XaXa) y linfocitos de mujer (XiXa). La posición de los genes se muestra en la Figura 3. Se utilizó el método de digestión sensible a metilación con la enzima HpaII. Las regiones de los promotores de los genes **POLA1** y

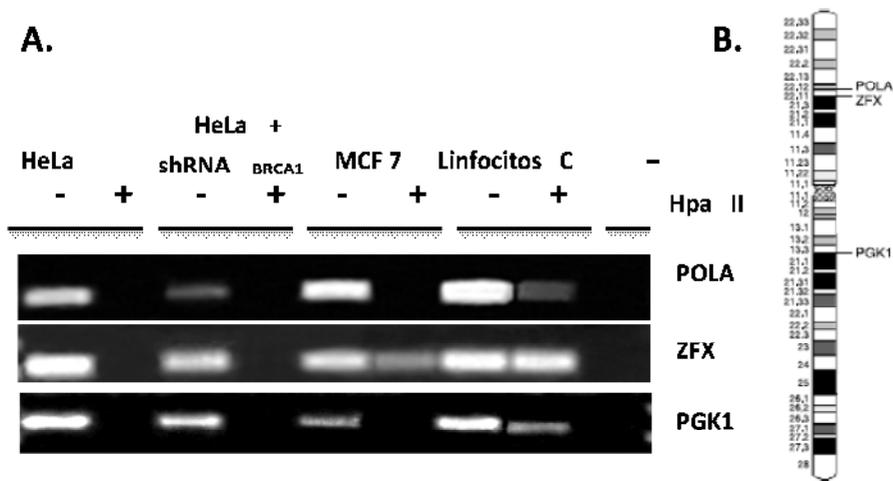


Figura 3. Evaluación del estado de metilación de los promotores de genes del cromosoma X. A. Digestión genómica con HpaII (+) y amplificación de promotores de los genes *POLA*, *PGK1* y *ZFX*. B. Posición de los genes evaluados, tomado y modificado de Sirchia et al, 2005 (23).

PGK1 evidencian desmetilación generalizada tanto en células HeLa (con/sin transfección anti-BRCA1) como en la línea control MCF7; en linfocitos XX control, se encontró el patrón esperado para los tres genes. Dado que no se esperaba una hipometilación en la región pro-

motora de éstos en la línea celular control, y al observar los niveles de expresión de los genes ligados al X (próxima sección), se puede inferir que la metilación de al menos las regiones promotoras evaluadas, no está siendo influenciada por los niveles de silenciamiento

inducidos en BRCA1. Por tal razón, se evidencia la necesidad de evaluar otros mecanismos epigenéticos conexos a la XCI, incluyendo promotores colindantes y modificaciones de histonas.

El gen **ZFX** amplificó en las muestras que no estaban tratadas con la enzima HpaII como se esperaba, pues este gen escapa a la inactivación, pero al analizar las muestras tratadas con la enzima, observamos que en MCF7 se presenta amplificación parcial, fenómeno que también se observó en algunas de las transfecciones analizadas; este resultado está pendiente de más análisis ya que la región del cromosoma X donde se ubica este gen escapa a la inactivación.

Cabe recordar que la hipo/hiper-metilación en las regiones promotoras de los genes ligados al cromosoma X puede variar considerablemente entre loci, en un rango entre 5 - 75% de los niveles de Xa; es la llamada heterogeneidad zonal relacionada a las diferencias en el ambiente molecular local de los genes (3) y al porcentaje de secuencias LINES en cada uno de ellos (14, 30, 31).

En la carcinogénesis, la hipermetilación de promotores es asociada a la pérdida de heterocigocidad en un mismo locus, resultando en la pérdida de función de un gen “protector”. Aún se desconocen los mecanismos o las reglas (si las hay) que determinan qué genes son metilados durante la patogénesis de un determinado tipo de cáncer. Sin embargo, existen marcadores específicos de metilación del DNA habitualmente asociados a tumores frecuentes y/o a otros procesos de inactivación cromosómica/génica, como la inactivación del cromosoma X. Algunos reportes indican que promotores ligados al X presentan hipometilación significativa, y se sugirió que estos cambios son tejido-específicos y género-específicos (32, 33). Otros estudios han analizado el estado de metilación del DNA y las modificaciones de la cromatina dentro de las regiones promotoras de los genes ligados al cromosoma X, y se ha encontrado desmetilación generalizada en las líneas celulares de cáncer de mama analizadas y ausencia de XIC. Para ello se ha planteado la explicación que la falta de represión epigenética en genes ligados al X en presencia de más de una copia del mismo cromosoma X, se originaría a partir de eventos de duplicación de todo un cromosoma Xa y eliminación del inactivo (23).

De ahí lo interesante de examinar el estado de metilación global de promotores en regiones sinténicas del cromosoma X, y su relación con el proceso de inacti-

vación dentro del contexto de la presente hipótesis de trabajo, que no gira alrededor de una doble aneuploidización tipo $-(Xi)$, $dup(Xa)$, sino mediante los efectos de la supresión de BRCA1 con RNA interferente. Sea una u otras las explicaciones, el hecho es que el cromosoma X alberga muchos genes que están diferencialmente expresados en tumores de mama y otros tipos de cánceres; la cuestión radica en descubrir cuales pueden contribuir al desarrollo tumoral según los cambios de expresión del X (21, 32).

Evaluación de la expresión de genes ligados al cromosoma X (QRT-PCR).

Mediante QRT-PCR se evaluó si la supresión de la síntesis de BRCA1 conlleva a cambios cuantitativos en la expresión de genes ligados al X (*POLAI*, *PGKI*, *OCRL* y *ZFX*). Inicialmente se realizó la calibración del gen de referencia *ZFX* (que no escapa a la inactivación); y los datos obtenidos de los genes *PGKI*, *POLAI* y *OCRL* fueron normalizados en relación a este gen, del cual se espera expresión disómica tipo autosoma, pues no se inactiva.

Los niveles de RNA mediante QPCR en tiempo real de los 4 genes ubicados en el cromosoma X humano, fueron evaluados en transfectadas y no-transfectadas. Se obtuvieron los respectivos valores CT para cada gen ligado al X. También se hicieron comparaciones con un control interno de células MCF7 que posee dos cromosomas X. Las eficiencias fueron calculadas por el software LinRegPCR (11.0), y oscilaron alrededor del valor óptimo de 2.0 que para este tipo de RTQ-PCR equivale a una eficiencia cercana al 100% (Valores observados entre 1.875 – 2.163, con un promedio de 2.054).

Los valores CT oscilaron entre 20.41 – 25.43, en este orden de menor a mayor: HeLa transfectadas, HeLa no-transfectadas y control MCF7; y como era de esperar, este orden se mantiene después de la corrección por eficiencia. Lo anterior indica que la transfección anti-BRCA1 aumenta los niveles de expresión de los genes *PGKI*, *POLAI* y *OCRL* ligados al X, ya que las transfectadas traspasan el umbral CT más rápidamente (menos ciclos) que las no-transfectadas, lo cual es evidencia de que la supresión parcial de BRCA1 influye en la reactivación de genes ligados al X, y por ende, el BRCA1 silvestre estaría influyendo en el proceso de inactivación del X. De otro lado, al comparar la expresión relativa entre ellos, se evidenció que, a pesar de ser mayor en las transfectadas, es oscilante con tendencia a

OCRL>POLA1>PGK1 (Figura 4).

Las ventajas de sensibilidad y especificidad de la PCR-

cuantitativa en tiempo real, han permitido demostrar experimentalmente que la expresión de loci “inactivos”

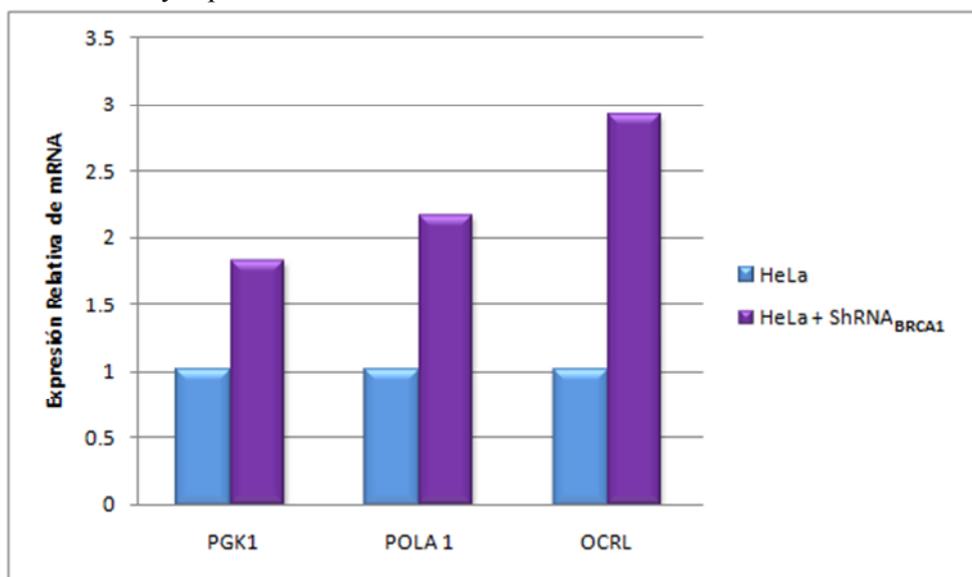


Figura 4. Niveles de expresión de tres genes ligados al cromosoma X (*PGK1*, *POLA 1* y *OCRL*) en relación a la expresión del gen *ZFX* que normalmente escapa a la inactivación.

en el Xi, puede estar entre el 5%-15% comparado con el activo (34). De ahí que las diferencias observadas en *POLA1*, *PGK1*, *OCRL* y *ZFX* en transfectadas y no-transfectadas con anti-BRCA1, constituyan evidencia a la hipótesis de que cambios cuantitativos en la expresión de *BRCA1*, puede conllevar a cambios cuantitativos en la expresión de genes ligados al X.

En otros estudios en los que se usaron modelos *invitro*, un análisis sistemático de transcritos ligados al X predijo que cerca del 15% de los genes del cromosoma X humano escapan a la inactivación pero con expresividad variable. En ratones se ha reportado que solo unos pocos genes escapan a la inactivación; y el descubrimiento de diferencias en el estado de inactivación de muchos de ellos en una región conservada entre el cromosoma X humano y el de ratón, se ha tomado como evidencia para explicar que el cromosoma X de ratón es pobre en genes que escapan a la inactivación (34).

En conclusión, a través de un enfoque metodológico alternativo, empleando shRNA-anti-BRCA1 y su relación con la XCI, apoya las interpretaciones de Ganesan y colaboradores (2002) y Silver y colaboradores (2007), ya que cuando BRCA1 fue depletado por RNAi en células HeLa, la expresión de los genes ligados al Xi aumentó al compararla con su expresión en células HeLa no de-

pletadas. Ello apoyaría la hipótesis de que BRCA1 está involucrada en el remodelamiento de la cromatina del cromosoma X que se “inactiva”, y por ende, la interferencia de la producción de la proteína BRCA1 genera un aumento en la expresión de genes ligados al cromosoma X inactivo.

De corroborarse estos hallazgos, tendrían implicaciones biológicas básicas y prácticas interesantes. De un lado la proteína autosómica BRCA1 podría estar participando en el complejo proceso de silenciamiento génico y remodelación de la cromatina Xi, permitiendo la expresión de genes que se encuentran en zonas habitualmente inactivas. Y en lo práctico/clínico, cabría pensar que en tumores de mama (y otros tipos de cánceres), BRCA1 tendría otras funciones fundamentales en el desarrollo de la oncogénesis mamaria.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad de Antioquia (Programa Sostenibilidad) y a la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República (Proyecto No: 2.594) por la financiación de esta investigación. También agradecen la colaboración de los grupos Gastrohepatología, GenMol, Neurociencias y PECET de la misma universidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Camargo M, Wang N. Cytogenetic evidence for the absence of an inactivated X chromosome in a human female (XX) breast carcinoma cell line. *Human Genetics*, 1980. 55(1):81.
2. Panning, B. X-chromosome inactivation: the molecular basis of silencing Barbara Panning. *Journal of Biology*, 2008. 7:30.
3. Leeb M, Wutz A. Mechanistic concepts in X inactivation underlying dosage compensation in mammals. *Heredity*, 2010. 105(1):64.
4. Barakat TS, et al. X-changing information on X inactivation. *Experimental Cell Research*, 2010. 316(5):679.
5. Chaligné R, Heard E. X-chromosome inactivation in development and cancer. *EEBS Letters*, 2014. 588:2514.
6. Maclary E, Hinten M, Harris C, Kalantry S. Long noncoding RNAs in the X-inactivation center. *Chromosome Research*, 2013. 21(6-7):601.
7. Briggs SF, Reijo Pera RA. X chromosome inactivation: recent advances and a look forward. *Current Opinions in Genetics and Development*, 2014. 28:78.
8. Mlynarczyk-Evans S, et al. X chromosomes alternate between two states prior to random X-inactivation. *PLoS Biology*, 2006. 4(6):e159.
9. Bacher C, et al. Transient colocalization of X-inactivation centres accompanies the initiation of X inactivation. *Nature Cell Biology*, 2006. 8(3):293.
10. Xu N, Tsai C, Lee J. Transient homologous chromosome pairing marks the onset of X inactivation. *Science*, 2006. 311(5764):1149.
11. Lee JT, Bartolomei MS. X-Inactivation, imprinting, and long noncoding RNAs in health and disease. *Cell*, 2013. 152:1308.
12. Chow J, Heard E. X inactivation and the complexities of silencing a sex chromosome. *Current Opinions in Cell Biology*, 2009. 21(3):359.
13. Clemson C, et al. XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *The Journal of Cell biology*, 1996. 132(3):259.
14. Pollex T, Heard E. Recent advances in X-chromosome inactivation research. *Current Opinions in Cell Biology*, 2012. 24:825.
15. Ganesan S, et al., BRCA1 supports XIST RNA concentration on the inactive X chromosome. *Cell*, 2002. 111(3):393.
16. Silver D, et al. Further evidence for BRCA1 communication with the inactive X chromosome. *Cell*, 2007. 128(5):991.
17. Brown C, Willard H. The human X-inactivation centre is not required for maintenance of X-chromosome inactivation. *Nature*, 1994. 368:156-6.
18. Kanellopoulou C, et al. X chromosome inactivation in the absence of Dicer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009. 106(4):1122.
19. Pageau G, et al. The disappearing Barr body in breast and ovarian cancers. *Nature Reviews Cancer*, 2007. 7(8):628.
20. Pageau G, Hall L, Lawrence J. BRCA1 does not paint the inactive X to localize XIST RNA but may contribute to broad changes in cancer that impact XIST and Xi heterochromatin. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2007. 100(4): 835.
21. Xiao C, et al. The XIST noncoding RNA functions independently of BRCA1 in X inactivation. *Cell*, 2007. 128(5):977.
22. Pageau G, Lawrence J. BRCA1 foci in normal S-phase nuclei are linked to interphase centromeres and replication of pericentric heterochromatin. *Journal of Cell Biology*, 2006. 175(5):693.
23. Sirchia S, et al. Loss of the inactive X chromosome and replication of the active X in BRCA1-defective and wild-type breast cancer cells. *Cancer Research*, 2005. 65(6):2139.
24. Promega. siRNA Target Designer - Version 1.5. 2009 [cited 2009 Marzo 2009]; Available from: <http://www.promega.com/sirnadesigner/program/>.

25. Zuker M, Mathews D, Turner D. Algorithms and thermodynamics for RNA secondary structure prediction: a practical guide. NATO ASI SERIES 3 HIGH TECHNOLOGY, 1999. 70:11.
26. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 2001. 29(9):e45.
27. López T, et al. RNA de Interferencia: El Silencio de los Genes. 2007. 14:109.
28. Obregon-Mansilla A. Estructura y Estabilidad de un Dominio Proteico BRCT. 2010, Universidad Nacional Mayor de San Marcos: Lima.
29. Ganesan S, et al. Association of BRCA1 with the inactive X chromosome and XIST RNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2004. 359(1441):123.
30. Lyon MF. Do LINEs Have a Role in X-Chromosome Inactivation? *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2006. 2006(59746):1.
31. Berletch JB, et al. Genes that escape from X inactivation. *Human Genetics*, 2011. 130(2):237.
32. Hellman A, Chess A. Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science (New York, NY)*, 2007. 315(5815):1141.
33. Kelkar A, Deobagkar D. Methylation profile of genes on the human X chromosome. *Epigenetics*, 2010. 5(7):612.
34. Lopes AM, et al. Transcriptional changes in response to X chromosome dosage in the mouse: implications for X inactivation and the molecular basis of Turner Syndrome. *BMC Genomics*, 2010. 11(1):1.