



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Facultat de Biociències

Departament de Genètica i Microbiologia

Unitat de Genètica

TESIS DOCTORAL

Los factores de transcripción TBX15 e YY1 en cáncer. Función y regulación de TBX15. Expresión de YY1 en cáncer de tiroides.

Memoria presentada por JÉSSICA ARRIBAS ARRANZ, en el marco de los Estudios de Doctorado en Genética de la Universitat Autònoma de Barcelona para optar al Grado de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Bellaterra, 2015.

La Directora de Tesis,

La autora,

Dra. Antonia Velázquez

Jéssica Arribas Arranz

“Lo peor no es cometer un error, sino tratar de justificarlo, en vez de aprovecharlo como aviso providencial de nuestra ligereza o ignorancia.”

Santiago Ramón y Cajal (1906)

ÍNDICE

ÍNDICE	i
RESUMEN	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
INTRODUCCIÓN	1
1. El cáncer como una alteración del proceso de diferenciación celular y de la apoptosis ...	2
2. Los factores de transcripción en la genética del cáncer	5
3. Los factores de transcripción T-box	8
3.1. Los factores de transcripción T-box en cáncer	12
3.2. El factor de transcripción TBX15.....	15
4. El factor de transcripción YY1	17
4.1. El factor de transcripción YY1 en cáncer	21
5. Factores de transcripción en la genética del cáncer de tiroides	24
OBJETIVOS.....	27
MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
1. Material biológico	29
1.1. Líneas celulares y medios de cultivo.....	29
1.2. Muestras de tejido tiroideo humano.....	31
1.2.1. Muestras congeladas	31
1.2.2. <i>Microarrays</i> de tejido (TMAs)	31
1.3. Anticuerpos.....	32
1.4. Cebadores	32
2. Métodos experimentales.....	34
2.1. Extracción y purificación de DNA.....	34
2.2. Extracción de RNA	34
2.3. Retrotranscripción	34
2.4. PCR cuantitativa.....	34
2.5. Modificación del DNA con bisulfito y posterior secuenciación de los fragmentos de DNA amplificados	35

2.6. Extracción de proteínas y <i>western blot</i>	35
2.7. Inmunohistoquímica	36
2.8. Inmunoprecipitación de cromatina	36
3. Tratamientos y ensayos celulares	38
3.1. Tratamientos celulares	38
3.1.1. Tratamiento con camptotecina	38
3.1.2. Estimulación con TNF α	38
3.1.3. Tratamiento con 5-aza-2'-deoxicitidina	39
3.2. Transfección celular	39
3.2.1. Transfección de plásmidos	39
3.2.2. Transfección de siRNA	41
3.3. Ensayos celulares	41
3.3.1. Contaje celular	41
3.3.2. Ensayo de apoptosis	41
3.3.3. Ensayo de formación de colonias en <i>soft agar</i>	42
3.3.4. Ensayo de luciferasa	42
3.3.5. Ensayo de migración celular	43
3.3.6. Ensayo de viabilidad celular	43
4. Análisis bioinformático	43
5. Análisis estadístico	44
RESULTADOS	45
1. Artículo I: Función de TBX15	45
1.1. Resumen	47
1.2. Artículo	49
2. Artículo II: Regulación de TBX15	51
2.1. Resumen	53
2.2. Artículo	55
3. Artículo III: Expresión de YY1 en cáncer de tiroides	57
3.1. Resumen	59
3.2. Artículo	61
DISCUSIÓN	63
1. TBX15 y cáncer	64
1.1. Función de TBX15 relacionada con el cáncer	65
1.2. Regulación de la expresión de TBX15	67
2. Expresión de YY1 en cáncer de tiroides	69
CONCLUSIONES	75
REFERENCIAS	77
AGRADECIMIENTOS	95

TBX15 e YY1 son dos factores de transcripción y los factores de transcripción, como moléculas transductoras de señales, ejercen un papel clave en la regulación de muchos procesos básicos del funcionamiento y fisiología de la célula, como pueden ser la proliferación celular, la inducción de la apoptosis o la reparación del DNA. Por lo tanto, la expresión y función aberrantes de los factores de transcripción son un punto importante en la aparición y desarrollo del cáncer.

Los factores de transcripción en cáncer actúan como oncogenes o genes supresores de tumores y su expresión se encuentra alterada en muchos tipos de cáncer. En cáncer de tiroides se ha descrito la asociación de ciertos factores de transcripción específicos del tiroides con este tipo de cáncer, pero no existe información acerca de la implicación de otros factores de transcripción generales, ni tampoco sobre TBX15 e YY1. La implicación de YY1 en cáncer está documentada; sin embargo, no existen estudios relativos a la posible implicación de TBX15 en cáncer. En este contexto, la presente tesis aporta conocimiento sobre el papel del factor de transcripción TBX15 en el desarrollo del cáncer, y se analiza la expresión de YY1 en cáncer de tiroides.

Nuestro estudio describe una nueva función del factor de transcripción TBX15 como inhibidor de la apoptosis celular, lo que puede contribuir al potencial proliferativo de las células cancerígenas y sugiere a TBX15 como una diana terapéutica potencial en el tratamiento del cáncer. También, hemos demostrado que NFκB regula positivamente la transcripción de *TBX15* mediante su unión a una región reguladora en la zona 5'-distal del gen *TBX15*. La relación entre TBX15 y NFκB puede ser importante para entender el papel de TBX15 en el cáncer.

Con referencia al factor de transcripción YY1, nuestros resultados representan el primer estudio sobre la implicación de YY1 en el cáncer de tiroides sin tener información previa sobre la expresión de este factor en este tipo de cáncer. Mostramos como YY1 se encuentra sobreexpresado en cáncer diferenciado de tiroides, siendo más frecuente su expresión positiva en el tipo papilar que en el folicular, poniendo en evidencia la posible implicación de YY1 en el cáncer de tiroides.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso secuencial del cáncer	3
Figura 2. Principales requisitos y características para la transformación celular.....	4
Figura 3. Alteración de la expresión de factores de transcripción durante la progresión tumoral y la metástasis	6
Figura 4. Esquema de los diferentes transcritos del gen <i>TBX15</i>	15
Figura 5. Esquema de los diferentes transcritos del gen <i>YY1</i>	17
Figura 6. Dominios funcionales de la proteína humana YY1	18
Figura 7. Modelos de la regulación de la transcripción por YY1	19
Figura 8. Interacción de YY1 con reguladores del ciclo celular.....	20
Figura 9. Modelo de los mecanismos con los que YY1 antagoniza al supresor de tumores p53	22
Figura 10. Representación esquemática del plásmido comercial pGL24.26	40

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos de las mutaciones en los genes T-box en humanos y ratones	11
Tabla 2. Expresión e implicaciones conocidas de los genes T-box en cáncer	12
Tabla 3. Significado clínico de la sobreexpresión de YY1 en algunos tipos de cáncer	23
Tabla 4. Patrones de expresión y alteraciones genéticas de factores de transcripción específicos del tiroides en el cáncer de tiroides.....	25
Tabla 5. Líneas celulares utilizadas en este estudio y condiciones de cultivo.....	30
Tabla 6. Anticuerpos utilizados en este estudio y sus características	32
Tabla 7. Cebadores utilizados en los distintos ensayos realizados en este trabajo	33

ABREVIATURAS

5-aza-dC: 5-aza-2'-deoxycytidine

A

ACTH: hormona

adrenocorticotropa

ATC: carcinoma anaplásico de tiroides

B

bp: pares de bases

BSA: suero de albúmina bovino

C

CDK: quinasa dependiente de ciclina

ChIP: inmunoprecipitación de cromatina

CML: leucemia mieloide crónica

CNIO: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas

CPT: camptotecina

D

DAB: diaminobenzidina

DMEM: medio Dulbecco's

Modified Eagle's

DMSO: dimetil sulfóxido

DSG: disuccinimidil glutarato

DSMZ: Leibniz Institute, (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares)

DTT: ditioneitol

E

EMT: transición epitelio/mesénquima

ER: receptor de estrógenos

EV: vector vacío

F

FA: adenoma folicular

FCS: suero fetal bovino

FITC: annexina-V-fluoresceína

FTC: carcinoma folicular de tiroides

FW: cebador en sentido

H

HDAC: histona desacetilasa

I

IHC: inmunohistoquímica

K

kb: kilobase

kDa: kiloDalton

KO: gen inactivado (*knock out*)

L

LB: caldo de lisogenia

M

MEF: fibroblastos embrionarios de ratón

N

NaPyr: piruvato sódico

neAA: aminoácidos no esenciales

NTS: dominio de localización nuclear

P

P: p-valor

PARP-1: polimerasa poli-ADP-ribosa 1

PBS: *tampon fosfato salino*

PcG: grupo Polycomb

PDAC: adenocarcinoma de células del conducto pancreático

PHR: región homóloga a la proteína PcG de *Drosophila*

PHO

PI: yoduro de propidio

PSA: antígeno específico de próstata

PTC: carcinoma papilar de tiroides

Q

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

R

RV: cebador antisentido

S

SCC: carcinoma de células escamosas

SD: desviación estándar

SDS: dodecilsulfato sódico

SNP: polimorfismo de un solo nucleótido

T

Ta: temperatura de hibridación

TBP: proteína de unión a la caja

TATA

TBX15.V: vector de expresión de

TBX15

TMA: microarray de tejido

W

WB: western blot

WT: tipo salvaje



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El punto de partida de este trabajo se corresponde con la asunción de que los factores de transcripción juegan un papel crucial en la carcinogénesis. En este contexto, partimos de la hipótesis genérica de que los factores de transcripción TBX15 e YY1 están implicados en procesos celulares relacionados con el cáncer. Si esta hipótesis es correcta, probablemente la expresión de estos factores estará alterada en muestras de cáncer (o/y en líneas celulares tumorales), y estudios funcionales nos permitirán concretar a qué nivel del control de su expresión se da la alteración. Asimismo, será necesario conocer la regulación de la expresión de dichos factores y descubrir su función relacionada con los procesos malignos que llevan al desarrollo tumoral.

El fundamento de nuestra hipótesis reside en estudios previos de asociación genética con el cáncer de tiroides en nuestro laboratorio. Uno de esos trabajos mostró que dos polimorfismos (rs4658973 y rs2145418) de la región 1p12 del cromosoma 1 son marcadores de susceptibilidad al cáncer de tiroides (Baida *et al*, 2008). El SNP rs2145418 se encuentra en una región muy conservada pero vacía de genes, hecho que hace pensar que se trata de una secuencia reguladora y, donde, mediante análisis *in silico*, se determinó la unión potencial del factor de transcripción YY1. El gen más cercano a este marcador, ubicado a 460kb, codifica para otro factor de transcripción, el TBX15.

En esta introducción se presentan las evidencias fundamentales que, combinadas, sustentan la hipótesis general del trabajo de tesis, junto con otros aspectos que nos permitirán discutir posteriormente los resultados experimentales obtenidos.

1. El cáncer como una alteración del proceso de diferenciación celular y de la apoptosis.

Los procesos de desarrollo se basan en la existencia de células progenitoras indiferenciadas que, de manera gradual, irán originando células con un potencial de diferenciación más limitado y que, a su vez, acabarán generando los distintos tipos celulares que constituyen un tejido, un órgano, o un organismo. Esta progresión está estrictamente controlada por factores de transcripción y reguladores epigenéticos que determinan los patrones finales de expresión génica de cada estadio de diferenciación y linaje celular, basado en el equilibrio de la acción de todos estos factores (Feinberg *et al*, 2007; Abollo-Jiménez *et al*, 2010). Así, la alteración del equilibrio establecido por los factores de transcripción, y/o de la memoria epigenética celular, pueden producir serios defectos en el desarrollo del organismo, y llevar a la aparición de enfermedades. Las patologías más relevantes que resultan de la alteración del control genético y/o epigenético de la identidad celular comprenden alteraciones del desarrollo y el cáncer. La estricta regulación génica que tiene lugar en condiciones fisiológicas normales permite mantener la homeostasis celular adecuada a los distintos niveles de diferenciación durante el desarrollo y el estado adulto. Así, las células mantienen su propia capacidad de crecimiento, estableciendo su equilibrio celular mediante la contraposición de dos procesos:

- La formación de nuevas células por mitosis que determina la tasa de proliferación. Este proceso se asocia al proceso simultáneo de diferenciación celular que es particular de cada tejido o estado del desarrollo.
- La apoptosis, muerte celular programada o suicidio celular, es el mecanismo fisiológico de eliminación de células al final de su vida activa. Forma parte del recambio celular necesario para contrarrestar la formación continuada por división celular. Igualmente, interviene en la formación de tejidos, en la morfogénesis y en la eliminación de células con daño genético.

De esta forma, las células de un organismo, en general, crecen, se dividen y mueren. Durante los primeros años de vida de un individuo las células se dividen con mayor rapidez permitiendo el crecimiento normal del organismo; en cambio, en la fase

adulta, la mayoría de células únicamente se dividen para reemplazar células dañadas o muertas. Un tumor aparece cuando las células adquieren la capacidad de dividirse indefinidamente y evitar la muerte, causando, por lo tanto, un crecimiento incontrolado. Estas células, además de crecer en su localización de origen, pueden llegar a invadir tejidos adyacentes o distales y es entonces cuando hablamos de cáncer. En la Figura 1 se resumen de forma esquemática las alteraciones más relevantes que conllevan al desarrollo tumoral, como es la alteración y/o desregulación de oncogenes y genes supresores de tumores, lo cual produce un aumento de las divisiones celulares, disminución de la apoptosis y descontrol de la proliferación. Sin embargo, en condiciones normales de función de estos genes, el equilibrio de estos procesos mantiene un estado de proliferación celular adecuado.

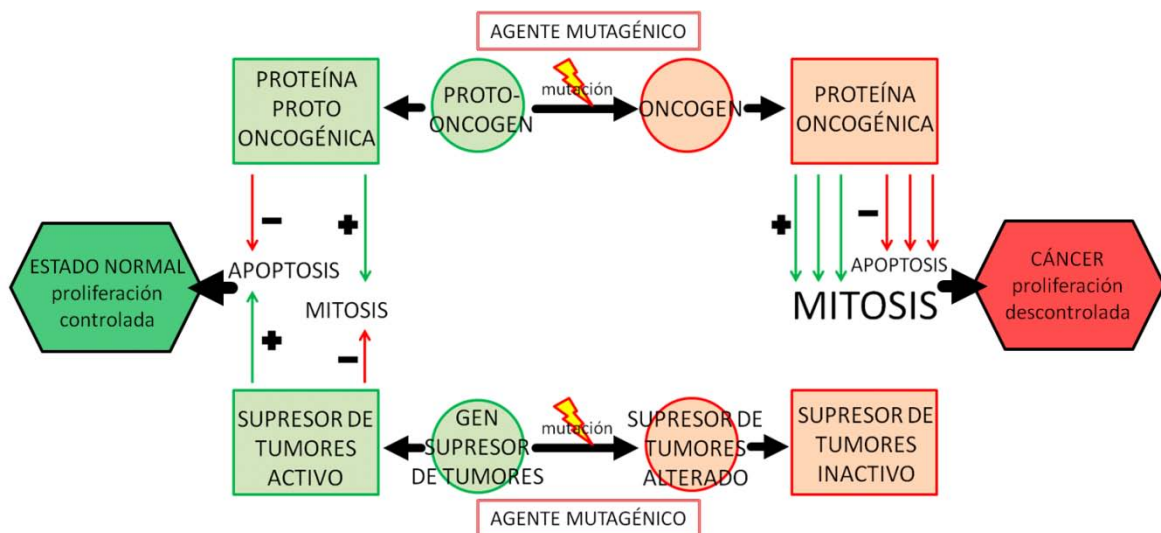


Figura 1. El cáncer es un proceso secuencial que implica la acumulación de mutaciones sucesivas en uno o varios genes de distintos tipos, seguidamente se produce una selección clonal de las células portadoras de las alteraciones que permiten el incremento de su capacidad proliferativa.

Para que una célula normal se transforme en cancerosa ha de cumplir una serie de requisitos descritos por Hanahan y Weinberg en el año 2000. Estos son: autosuficiencia para proliferar en ausencia de señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitorias de proliferación, evasión de la muerte celular programada o apoptosis, adquisición de potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, e invasión de tejidos y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000). Recientemente, el avance en el conocimiento de los procesos cancerígenos permite añadir otros dos

factores: la reprogramación del metabolismo energético y la evasión de la destrucción provocada por la respuesta inmune (Figura 2, Hanahan y Weinberg, 2011). La adquisición de todas estas propiedades es posible gracias a dos características. Una de ellas es la respuesta inflamatoria que se da en lesiones crónicas, en la cual participan células del sistema inmunitario que, en algunos casos, liberan moléculas bioactivas y/o sustancias químicas que actúan sobre las células vecinas induciendo el desarrollo tumoral. Otra de las características que permite la transformación celular es la inestabilidad genómica, que da lugar a mutaciones aleatorias, deleciones, translocaciones, amplificaciones y ganancia o pérdida de un cromosoma completo, y que, generalmente, conllevan a la activación de oncogenes o la inactivación de genes supresores de tumores.

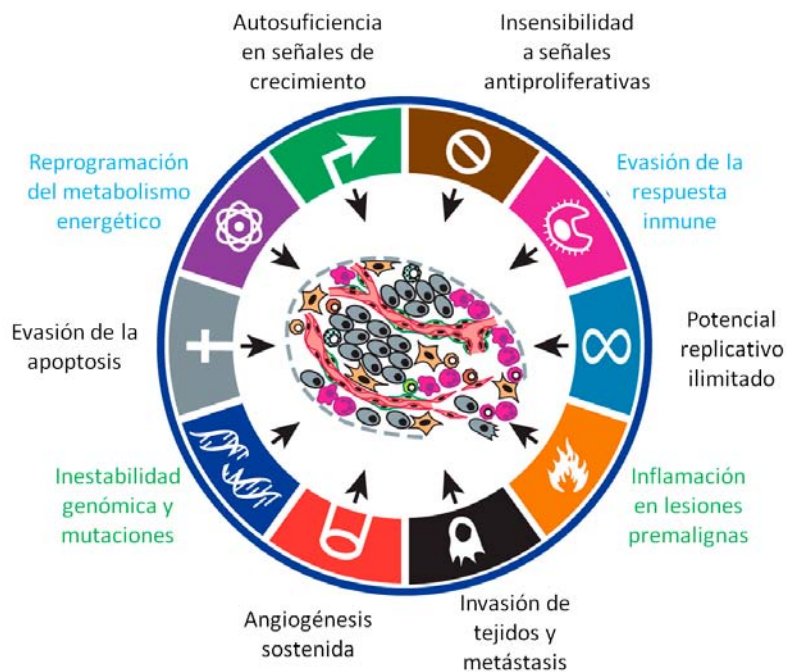


Figura 2. Principales requisitos y adquisición de las funciones necesarias para la transformación celular. En letra negra se describen los requisitos para la progresión tumoral descritos inicialmente por Hanahan y Weinberg en el año 2000; en letra azul, los dos requisitos incorporados recientemente; y en letra verde, se especifican las características que permiten la transformación celular. Adaptado de Hanahan y Weinberg, 2011 (Hanahan y Weinberg, 2011).

Así, el cáncer se puede definir como una enfermedad genética donde las células tumorales se caracterizan por una proliferación incontrolada con una velocidad de división mayor que la de las células normales de las que proceden. Esta es una característica propia de células poco diferenciadas, estando significativamente

anulados o reducidos los procesos diferenciativos, además de presentar defectos en el control del ciclo celular y la apoptosis.

Las proteínas implicadas en el desarrollo del cáncer tienen funciones celulares distintas y se localizan en diferentes compartimentos subcelulares, esto indica que pueden participar en el control del crecimiento celular a través de distintos niveles en las rutas de señalización. Así, muchas de las oncoproteínas son versiones mutadas de factores de crecimiento o receptores, actuando en los primeros pasos de las vías de señalización, pero también existe un gran número de oncoproteínas nucleares, participando en eventos más tardíos de la regulación génica, como factores de transcripción.

2. Los factores de transcripción en la genética del cáncer

Los factores de transcripción son proteínas que coordinan y regulan la expresión de un gen o de un grupo de genes. Interaccionan con regiones específicas del DNA, con elementos de la maquinaria de transcripción como la RNA polimerasa, con otros factores de transcripción o con moléculas que activan o inhiben su actividad. De esta manera, conectan los estímulos externos e internos con las respuestas biológicas, actuando como transductores de señales y ejerciendo un papel clave en la regulación de procesos de proliferación celular, inducción de apoptosis y/o reparación del DNA.

La activación oncogénica de factores de transcripción determina que puedan actuar constitutivamente sin necesidad de señales externas, estimulando de manera continuada la síntesis de proteínas implicadas en la promoción del ciclo celular, la evasión de la apoptosis, la angiogénesis, la capacidad de invadir los tejidos o de generar metástasis, hechos característicos del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011).

Así, la expresión y función aberrantes de los factores de transcripción son un punto importante en la transformación oncogénica de las células de los diferentes tejidos (Figura 3). De hecho, se ha descrito un papel clave en el desarrollo y progresión de varios tipos de cáncer de factores de transcripción como c-MYC, Fos, Jun, NFkB y P53, entre otros.

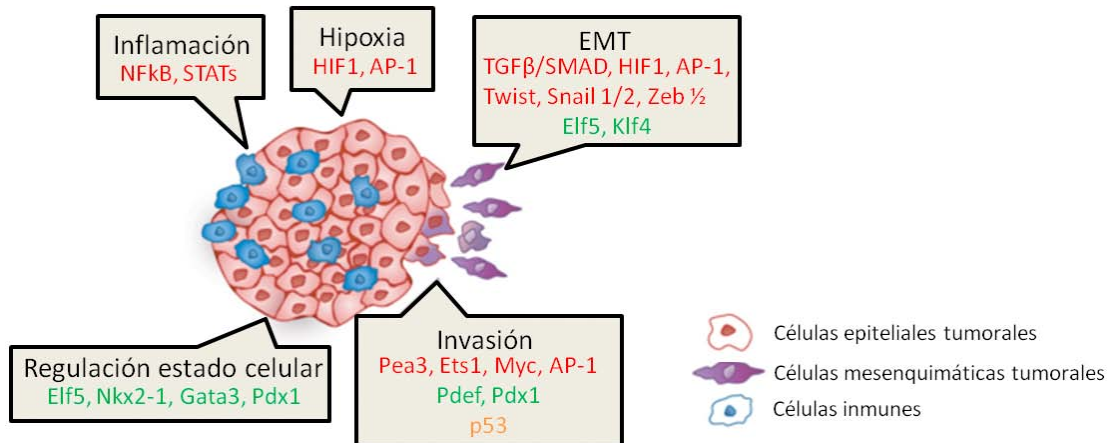


Figura 3. La expresión de diferentes factores de transcripción puede verse alterada durante la progresión tumoral y la metástasis. Algunos pueden sobreexpresarse (en rojo), disminuir su expresión (en verde) o sufrir mutaciones de falta de funcionalidad (en naranja). La combinación de estas alteraciones conllevará a la formación y evolución del cáncer, afectando a diferentes niveles: regulación del estado celular, inflamación, respuesta a la hipoxia, transición epitelio/mesénquima, y metástasis. Adaptado de Eil y Kang, 2013. EMT: transición epitelio/mesénquima.

c-MYC es un factor de transcripción de la familia MYC/MAX/MAD que puede activar o reprimir la expresión de gran variedad de genes. Es capaz de activar la transcripción gracias a la formación de un heterodimero con MAX y su unión directa a la secuencia de DNA 5'-CACGTG-3', llamada E-box (Kretzner *et al.*, 1992). La dimerización con MAX y su unión a las secuencias E-box del DNA son esenciales para la función de MYC en promover la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la transformación celular (Amati *et al.*, 1998). La desregulación de la expresión de MYC es uno de los eventos más frecuentes en cánceres humanos, estando implicado en la mitad de los casos. Los genes diana de MYC están relacionados con muchos aspectos de la fisiología celular, pero sobretodo son importantes aquellos que intervienen en el crecimiento y proliferación celular. Los efectos proliferativos de MYC afectan varios puntos de la regulación del ciclo celular; por ejemplo, MYC activa la transcripción de las ciclinas D y las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) para promover la progresión del ciclo celular, a la vez que reprime la expresión de las ciclinas de la familia CIP/KIP e inhibidores de las CDKs. Para preparar la célula para su división, MYC aumenta la biogénesis ribosomal y la traducción permitiendo a la célula la fabricación de proteínas y la acumulación de biomasa. MYC también modula varias vías metabólicas de la célula, como la regulación de la utilización de glucosa o

la homeostasis del hierro. Así, el descontrol de la actividad de MYC es un estímulo oncogénico muy potente. MYC también presenta propiedades proapoptóticas pero este efecto en la muerte celular queda amortiguado en el proceso de transformación (Revisado en Shortt y Johnstone, 2012).

El factor de transcripción AP-1 consiste en un conjunto de dímeros compuestos por miembros de las familias Fos, Jun y ATF. Mientras que las proteínas Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) pueden únicamente formar heterodímeros con miembros de la familia Jun, las proteínas Jun (c-Jun, JunB, JunD) pueden formar homodímeros o heterodimerizar con los miembros Fos dando lugar a complejos transcripcionalmente activos. AP-1 es capaz de transmitir señales extracelulares provocando cambios en la expresión de sus genes diana, implicados en gran variedad de procesos biológicos, incluidos la diferenciación celular, proliferación, apoptosis y la transformación oncogénica (Revisado por Jochum *et al.*, 2001). La unión de AP-1 al DNA y, así, su actividad transcripcional se induce rápidamente por factores de crecimiento, citoquinas y oncoproteínas. De esta forma, los factores AP-1 pueden transformar fácilmente células en cultivo y, en ratón, la sobreexpresión de c-Fos y c-Jun induce osteosarcoma y tumores de piel e hígado, respectivamente (Wang *et al.*, 1991; Eferl *et al.*, 2003). AP-1 también regula genes que se requieren en la metástasis tumoral que están asociados con la pérdida de la polaridad celular, involucrados en la transición epitelio/mesénquima (Revisado por Libermann y Zerbini, 2006).

Otro ejemplo de factores de transcripción implicados en cáncer es la familia NFκB. Se trata de un grupo de proteínas que después de ser activadas en el citoplasma ejercen su función reguladora en el núcleo. Se ha demostrado que las proteínas NFκB presentan un papel esencial en la regulación de múltiples funciones como la inflamación, proliferación, supervivencia o la apoptosis, en diferentes tipos de células o incluso dentro de un mismo tejido o tipo celular, dependiendo del contexto microambiental en el que se encuentren. Así, la activación o la sobreexpresión del factor NFκB se han asociado con cáncer y metástasis por su papel en la regulación de la progresión del ciclo celular y la apoptosis. De hecho, muchos tumores expresan de forma constitutiva NFκB (Revisado por Xiao y Fu, 2011).

Como ejemplo de factor de transcripción que actúa como supresor de tumores tenemos a p53. P53 (llamado “el guardián del genoma”) es un factor de transcripción que está directamente implicado en detener la formación y desarrollo de tumores, de

hecho, es el gen más frecuentemente mutado en el cáncer humano. P53 se activa cuando la célula sufre daño en el DNA o cuando es sometida a estrés celular. Bajo estas condiciones, P53 sufre un proceso de activación post-traducciona l modulando la expresión de genes que conllevan a la parada del ciclo celular, la reparación del DNA o la entrada en apoptosis (Revisado por Sigal y Rotter, 2000).

Existen evidencias de que otros muchos factores de transcripción pueden actuar en los procesos tumorales, de los cuales se tiene más o menos información de los procesos celulares en los que intervienen. En todo caso, los factores de transcripción cuyas funciones en condiciones celulares normales están asociadas con la apoptosis, la proliferación o la regulación del ciclo celular, tienen un papel en la oncogénesis. En nuestro trabajo estudiamos dos factores de transcripción: YY1, del cual ya se ha descrito alguna implicación en ciertos tipos de cáncer; y TBX15, un factor esencial durante el desarrollo.

3. Los factores de transcripción T-box

Los factores de transcripción T-box están codificados por los genes T-box que forman una familia génica muy conservada a lo largo de la evolución en todo el grupo de los metazoos, desde *hydra* hasta humanos.

La característica que unifica a los miembros de esta familia es la posesión del dominio T-box, una región altamente conservada de unos 180-200 aminoácidos que permite la unión específica a las regiones de reconocimiento del DNA. Las secuencias reconocidas en el DNA están, asimismo, muy conservadas a lo largo de la evolución y se definen por la secuencia consenso 5'-AGGTGTGA-3', también denominada sitio T/2, que inicialmente fue identificada *in vitro* como el sitio de unión del factor Brachyury (T), primer miembro de la familia identificado (Kispert y Herrmann, 1993). Se ha demostrado que todas las proteínas de la familia T-box pueden unirse al sitio T/2 (Wilson y Conlon, 2002) pero la habilidad para hacerlo difiere entre ellos y depende de varios factores. Primeramente, la interacción proteína-DNA está determinada por la secuencia y estructura completa de la proteína. Por ejemplo, TBX2 interacciona con el sitio T/2 más eficientemente que TBX1, ya que a pesar de que éste puede unirse a sitios T/2 individuales, su eficiencia reside en la interacción con los sitios palindrómicos (Sinha *et al.*, 2000). Además, un residuo arginina dentro del dominio T-box parece ser

necesario para la unión al sitio consenso. Así, Müller y Herrmann (1997) mostraron que el aminoácido 67 (arginina) interaccionaba directamente con una guanina en el surco mayor del DNA. Modificaciones químicas en la secuencia T/2 también alteran la capacidad de unión al DNA; por ejemplo, Carreira y colaboradores (1998) demostraron que la metilación de la guanina central de la secuencia interfiere en la capacidad de unión del factor TBX2.

Los miembros de la familia T-box comparten también un dominio de localización nuclear (NTS) para poder entrar en el núcleo, pero fuera del dominio T-box, los factores muestran numerosas diferencias de estructura, reflejando propiedades moleculares diversas. Así, dependiendo de la presencia de un dominio activador o represor, las proteínas T-box pueden modular de manera diferente la expresión génica. En algunos casos, la función reguladora de los factores T-box depende del entorno celular y del contexto en el que se encuentra el promotor (Paxton *et al.*, 2002). Hasta el momento, el número de genes identificados que son regulados directamente por factores de la familia T-box es limitado. Estos genes, generalmente muestran más de una secuencia de reconocimiento T-box, lo que podría indicar la necesidad de cooperación entre varios factores T-box u otros factores para regular sus genes diana. Por ejemplo, TBX6 regula la expresión de genes en el desarrollo de los somitas con la cooperación de la vía de señalización Notch (Yasuhiko *et al.*, 2006).

Como se ha indicado, la familia T-box incluye tanto a activadores como a represores transcripcionales. Brachyury actúa como activador (Kispert *et al.*, 1995), al igual que muchos otros integrantes de la familia. TBX5, por ejemplo, puede activar la expresión de ANF en combinación sinérgica con otro factor de transcripción, Nkx2.5 o GATA4 (Fan *et al.*, 2003); y TBX1 activa el factor de crecimiento de fibroblastos 10 (FGF10) (Xu *et al.*, 2004). La función represora de los factores T-box es menos frecuente, como TBX2, TBX3 o TBX20. Plageman y Yutzey. (2004) mostraron que, mientras TBX5 activaba la expresión de ANF, TBX20 la reprimía mediante su dominio de represión en el extremo C-terminal (Stennard *et al.*, 2003). Otro ejemplo de interacción entre factores T-box es la que se presenta entre TBX15 y TBX18, ambos pueden actuar como represores de la transcripción formando homodímeros o heterodímeros entre ellos y conjuntamente con co-represores de la familia Groucho (Farin *et al.*, 2007). Resulta interesante el hecho de que TBX2 y TBX20 presenten tanto un dominio de activación como de represión (Paxton *et al.*, 2002; Stennard *et al.*,

2003), función dual demostrada para TBX2, inicialmente caracterizado como potente represor transcripcional.

Por lo tanto, los factores T-box forman una amplia familia de factores de transcripción que regulan genes implicados en funciones diversas. El mecanismo de regulación por estos factores es diverso y complejo, actuando como reguladores inhibidores o activadores que en muchos casos requiere de la acción conjunta de otros factores de transcripción.

El papel de los factores T-box durante el desarrollo está ampliamente reconocido. La gran mayoría de genes T-box estudiados hasta el momento presentan patrones de expresión muy específicos durante el desarrollo. Destacar que estudios de pérdida de función en ratón y en otros organismos modelos han revelado funciones relevantes en diferentes procesos y estadios del desarrollo, incluidos la formación y el establecimiento de patrones del mesodermo y organogénesis (Naiche *et al.*, 2005). En los mamíferos se conocen 18 miembros de la familia que, basándose en la secuencia T-box, se clasifican en cinco subfamilias como se indica en la Tabla 1, donde se muestra además los síndromes producidos por las deficiencias conocidas en cada uno de los genes T-box en humanos y el fenotipo que manifiesta el modelo de ratón mutante homocigoto.

Las enfermedades humanas provocadas por mutaciones en ciertos genes T-box son diversas y en muchos casos son desconocidas, pero la construcción de ratones con inactivación de genes T-box demuestra que muchas de estas mutaciones son letales en homocigosis (Tabla 1). Así, personas con mutaciones en el gen *brachyury* presentan agenesia del sacro con anomalías vertebrales, además de defectos en el tubo neural (Postma *et al.*, 2014). Mutaciones en *TBX19* provocan deficiencias en la hormona adrenocorticotropina (Lamolet *et al.*, 2001). Los síndromes de DiGeorge y el velocardiofacial, caracterizados por defectos cardíacos y faciales, hipoplasia del timo, paladar hendido e hipoparatiroidismo, son causados por microdeleciones en la región cromosómica 22q11.2 que afectan al gen *TBX1* (Yagi *et al.*, 2003). La deficiencia del gen *TBX15*, causada por mutaciones que truncan la proteína, genera el síndrome de Cousin (o displasia pelviescapular), enfermedad que se caracteriza por una hipoplasia escapular y una anomalía en la morfología cráneo-facio-cervical, entre otras deformaciones complejas (Lausch *et al.*, 2008). Mutaciones en *TBX20* se asocian a defectos congénitos del corazón (Kirk *et al.*, 2007)

y mutaciones en el gen *TBX22* provocan el síndrome del paladar hendido con anquiloglosia (Braybrook *et al.*, 2001). El síndrome *ulnar-mammary*, enfermedad que afecta al desarrollo de las extremidades, glándulas apocrinas, dientes y genitales, es causado por mutaciones en *TBX3* (Bamshad *et al.*, 1997). También se han identificado mutaciones en el gen *TBX4* en familias con el síndrome de la rótula pequeña, caracterizado por anomalías en las extremidades inferiores (Bongers *et al.*, 2004). Las mutaciones en *TBX5* provocan el síndrome de Holt-Oram, donde los heterocigotos presentan defectos en el corazón y en las extremidades superiores (Li *et al.*, 1997). Otra enfermedad, caracterizada por un desarrollo anormal de la columna y vértebras, la disostosis espondilocostal, está causada por mutaciones en el gen *TBX6* (Sparrow *et al.*, 2013).

Tabla 1. Efectos de las mutaciones en los genes T-box en humanos y ratones (modificada de Naiche *et al.*, 2005).

Subfamilia	Gen	Síndrome humano	Fenotipo en ratones mutantes KO
T	<i>Brachyury (T)</i>	Agenesia del sacro con anomalías vertebrales.	Letal; fallo en el mesodermo posterior.
	<i>TBX19</i>	Deficiencia recesiva de ACTH.	Deficiencia de ACTH, defectos en la pigmentación.
Tbx1	<i>TBX1</i>	Di George.	Letal; anomalías cranofaciales, glandulares, vasculares y cardíacas.
	<i>TBX10</i>	desconocido	Labio leporino y paladar hendido.
	<i>TBX15</i>	Cousin.	Malformaciones viables a nivel cranofacial, defectos esqueléticos, alteración de la pigmentación.
	<i>TBX18</i>	desconocido	Letal; malformaciones vertebrales.
	<i>TBX20</i>	Defecto en el septo atrial 4.	Letal; anomalías cardíacas.
	<i>TBX22</i>	Abruzzo-Erickson (ABERS); paladar hendido con anquiloglosia (CPX).	Paladar hendido con anquiloglosia.
	<i>TBX2</i>	desconocido	Letal; anomalías cardíacas y en las extremidades.
Tbx2	<i>TBX3</i>	<i>Ulnar-mammary</i> .	Letal; defectos en extremidades y glándulas mamarias.
	<i>TBX4</i>	Rótula pequeña.	Letal; defectos en alantoides y extremidades posteriores.
	<i>TBX5</i>	Holt-Oram.	Letal; anomalías cardíacas severas.
Tbx6	<i>TBX6</i>	SCDO5 (desarrollo anormal de la columna y costillas).	Letal; anomalías en los somitas.
Tbr1	<i>TBR1</i>	desconocido	Defectos corticales y en el bulbo olfatorio.
	<i>EOMES</i>	desconocido	Letal; fallo del trofoblasto.
	<i>TBX21</i>	desconocido	Hipersensibilidad respiratoria, falta de células Th1.

KO (*knock out*): mutante con el gen inactivado.

3.1. Los factores de transcripción T-box en el cáncer.

Procesos celulares que se adquieren durante la desdiferenciación celular en los diferentes estadios del cáncer, como la plasticidad fenotípica, la capacidad de invasión o de proliferación celular, son rasgos que poseen las células durante el desarrollo embrionario; por lo tanto, resulta lógico pensar que factores de transcripción importantes en el desarrollo, como los miembros de la familia T-box, tengan un papel importante en la carcinogénesis (Briegel, 2006). De hecho, estudios recientes muestran niveles anormales de algunos factores T-box en diferentes tipos de cáncer (como Brachyury, Eomes, TBX1, TBX2, TBX3, TBX4, TBX5 y TBX21), relacionando su expresión alterada directamente con la oncogénesis, y además muestran funciones oncogénicas o supresoras de tumores (Wansleben *et al.*, 2014). En la Tabla 2 se resume la información que existe en la bibliografía sobre la expresión y función de los genes T-box en cáncer.

Tabla 2. Expresión e implicaciones conocidas de los genes T-box en cáncer.

Gen	Expresión en cáncer	Función en cáncer	Referencias
<i>T</i>	Sobreexpresado en varios cánceres.	Induce EMT en las células tumorales.	Palena et al., 2007; Fernando et al., 2010.
<i>TBX1</i>	La expresión se pierde con el desarrollo del tumor.	Regulador negativo del crecimiento del tumor, mantiene la inhibición de crecimiento por contacto celular.	Tremplus et al., 2012.
<i>TBX2</i>	Sobreexpresado en cáncer de mama, de páncreas y algunos melanomas.	Promueve la proliferación y la transformación celular, inhibiendo genes supresores de tumor.	Vance et al., 2005; Jacobs et al., 2000; Prince et al., 2004.
<i>TBX3</i>	Sobreexpresado en cáncer de hígado, de mama, de ovario y algunos melanomas.	Necesario para la formación del tumor y la migración celular. Promueve la proliferación celular y es un regulador negativo de la apoptosis.	Rodríguez et al., 2008; Brummelkamp et al., 2002.
<i>TBX4</i>	Bajos niveles en adenocarcinomas de páncreas. Marcador de pronóstico.	Supresor de tumores.	Qi et al., 2008; Zong et al., 2011.
<i>TBX5</i>	Silenciado en cáncer de colon por metilación de su promotor.	Supresor de tumores. Induce apoptosis, inhibe la proliferación y metástasis.	Yu et al., 2010.
<i>EOMES</i>	Relación inversa entre su expresión y la presencia de metástasis en colon.	Supresor de tumores. Activa el sistema inmunitario, reduciendo la metástasis.	Atreya et al., 2007.
<i>TBX15</i>	Marcador diferentemente metilado en cáncer de próstata.	Desconocida. Objeto de estudio en este trabajo.	Kron et al., 2012.
<i>TBX21</i>	Sobreexpresado en cáncer de mama ER α positivos.	Promueve tumorigénesis y resistencia a terapias hormonales y con tamoxifen.	McCune et al., 2010.

EMT: transición epitelio-mesénquima; ER: receptores de estrógenos.

Dos genes T-box muy relacionados, *TBX2* y *TBX3*, están sobreexpresados en varios cánceres humanos: mama, páncreas, ovarios y cérvix, y melanomas (Vance *et al.*, 2005; Rodriguez *et al.*, 2008). Estos dos factores se comportan como represores transcripcionales (Rowley *et al.*, 2004), y se ha demostrado que facilitan la tumorigenesis mediante la inhibición de p14^{ARF} y p21 evitando, así, la senescencia y facilitando la transformación celular (Jacobs *et al.*, 2000; Brummelkamp *et al.*, 2002; Prince *et al.*, 2004). *TBX2* y *TBX3* también afectan a diferentes aspectos en la transformación, crecimiento y migración celular. Se ha demostrado que en células de melanomas y cáncer de mama *TBX2* regula la transformación y proliferación pero no la migración celular, mientras que *TBX3* promueve la formación del tumor y la metástasis (Peres *et al.*, 2010).

Por otro lado, *TBX1* actúa como regulador negativo en el crecimiento tumoral, reestableciendo la inhibición por contacto. De hecho, la expresión ectópica de *TBX1* en células tumorales de piel evita la transformación y la proliferación celular, revirtiendo el fenotipo de las células a uno menos permisivo hacia el crecimiento descontrolado y libre de contacto y, de esta forma, mitigando los efectos del oncogen *ras*. (Trempeus *et al.*, 2012)

Otro miembro de la familia T-box, el gen *brachyury*, se encuentra sobreexpresado en varios tumores, incluyendo en el cáncer de esófago, vesícula y ovario (Palena *et al.*, 2007). Se ha demostrado que la expresión ectópica de *brachyury* en células de carcinoma concluye en la transición epitelio/mesénquima, con evidencias de un incremento en la migración e invasión, pero con un efecto muy limitado en el crecimiento del tumor primario. Además, se ha indicado que *brachyury* es capaz de detener la progresión del ciclo celular mediante la represión transcripcional de la *ciclina D1* y la inhibición de la formación del complejo ciclina/CDK, demostrándose su papel en la regulación del ciclo celular en el punto de control G1/S (Fernando *et al.*, 2010).

TBX21 se encuentra sobreexpresado en cánceres con carácter hormonal, por ejemplo, en varios cánceres de mama ER α positivos, donde actuaría promoviendo la tumorigenesis. La alta expresión de *TBX21* resulta en la ruptura de la vía de señalización del receptor de estrógenos, promoviendo la resistencia a la terapia hormonal y un pronóstico desfavorable; parece que esta resistencia se lleva a cabo

por la vía los factores Gata3 y FoxA1. Además, la sobreexpresión de *TBX21* genera mayor resistencia de las células cancerosas al tratamiento con tamoxifen en presencia de insulina, sobreactivando a ERK y AKT (McCune *et al.*, 2010).

De manera similar a *TBX1*, el gen *TBX5*, es capaz de suprimir el crecimiento de células cancerosas (Hatcher *et al.*, 2001; He *et al.*, 2002), de reducir la formación de colonias *in vitro* (He *et al.*, 2002) y promover la apoptosis (Yu *et al.*, 2010). El promotor de este gen se encuentra metilado en cáncer de colon, estando disminuida la expresión de *TBX5* en este tipo de cáncer (Yu *et al.*, 2010). Todo ello conlleva a considerar a *TBX5* un gen supresor de tumores. Igualmente, *TBX4* podría actuar como supresor de tumor en adenocarcinomas de células del conducto pancreático (PDAC) y algunos tipos de carcinomas hepáticos (Qi *et al.*, 2008; Zong *et al.*, 2011), identificando a *TBX4* como biomarcador de PDAC donde bajos niveles de expresión de este factor se correlacionan con el estadio del tumor, la metástasis y el peor pronóstico del paciente. Otro miembro de la familia, *Eomes*, también parece estar implicado en la supresión de tumores, con un papel importante en la lucha del propio sistema inmunitario ante el cáncer colorectal (Atreya *et al.*, 2007). En este caso, de manera diferente al resto de los factores T-box, *Eomes* reduciría la metástasis en cáncer de colon, activando las células inmunitarias T CD8+ mediante la inducción de la vía de la perforina.

No existe información del posible papel de *TBX15* en el desarrollo del cáncer. Kron y colaboradores (2012) observaron que este gen se encuentra diferencialmente metilado en cáncer de próstata, mostrándose como un buen marcador del estadio de la enfermedad, ya que su grado de metilación presenta una relación directa con la malignidad del tumor.

Así, en este momento queda reconocido que los factores de transcripción T-box participan en el desarrollo tumoral ejerciendo diferentes funciones reguladoras que afectan a la proliferación celular, la invasión y la metástasis.

3.2. El factor de transcripción TBX15

El gen humano que codifica para el factor de transcripción TBX15 se ubica en el cromosoma 1 en la posición 118,883,046-118,989,556 (*Genome Reference Consortium* GRCh38.p2) (Agulnik *et al.*, 1998). Se han definido 3 transcritos para este gen que se representan en la Figura 4 (www.ensembl.org) y dos isoformas para la proteína TBX15 (Q96SF7, *UniProtKB*), que difieren en 106 aminoácidos de la región N-terminal. La isoforma proteica tomada como canónica está compuesta por 602 aminoácidos y tiene un peso molecular de unos 65 kDa.

TBX15 pertenece a la subfamilia Tbx1 de los factores de transcripción T-box (ver Tabla 1). En este grupo se encuentra también *TBX18* que está estrechamente relacionado con *TBX15*, mostrando más de un 87% de similitud (84% identidad) en los aminoácidos que componen el dominio T-box, y hasta un 67% de similitud (55% de identidad) tomando el total de la proteína.

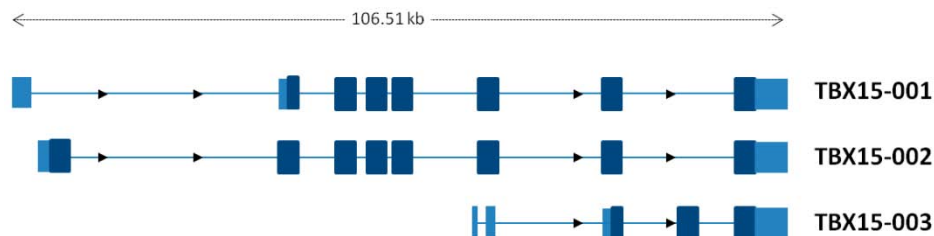


Figura 4. Esquema de los diferentes transcritos del gen *TBX15*. Cada uno de los bloques azules representa un exón que se encuentra en el RNA mensajero, en azul oscuro se indican las secuencias que se traducirán a proteína.

Como ya mencionamos anteriormente y se muestra en la Tabla 2, *TBX15* juega un papel importante durante el desarrollo, de tal forma que mutaciones de este gen tanto en humanos como en ratones produce graves alteraciones (síndrome de Cousin en humanos y ratón *droopy ear*), y la eliminación de *TBX15* en ratón resulta en malformaciones craneales, cervicales, escapulares y de los elementos de la parte superior de la columna vertebral (Lausch *et al.*, 2008). También se ha descrito la importancia de *TBX15* en la regulación de la proliferación de células mesenquimáticas y del desarrollo de los condrocitos (Singh *et al.*, 2005).

TBX15 se expresa en cerebro, huesos, intestino, hígado, testículos, timo y músculo y se ha sugerido como marcador de tejido adiposo subcutáneo frente a otros tipos de tejido adiposo (Gesta *et al.*, 2007; Lausch *et al.*, 2008). Gburcik y colaboradores (2012) lo describieron como marcador de adipocitos marrones y beige. De hecho, en roedores, *TBX15* presenta un patrón de distribución dorso-ventral que mimetiza la distribución de la proteína agouti, regulador de la ingesta alimentaria y del proceso metabólico (Candille *et al.*, 2004). De aquí se desprende su importancia en la acumulación y distribución del tejido corporal graso, expresándose en el tejido adiposo visceral, lo cual se relaciona negativamente con el sobrepeso (Gesta *et al.*, 2006). Por lo tanto, la disminución de la expresión de *TBX15* podría relacionarse con la patogénesis de la obesidad y, de hecho, se ha descrito que *TBX15* actúa a nivel celular en la diferenciación de los adipocitos y en la respiración mitocondrial (Gesta *et al.*, 2011). Además, un reciente análisis del genoma, basado en estudios de asociación, ha revelado una variante genética de *TBX15* asociada fuertemente con la ratio de la medida cintura/cadera, tanto en hombres como en mujeres con obesidad (Heid *et al.*, 2010).

La información acerca de la función reguladora de *TBX15* es muy escasa, y no existe información de los genes regulados por *TBX15*. *TBX15* podría actuar como represor ya que se ha demostrado que en combinación con correpresores de la familia Groucho disminuye la transcripción de algunos genes. También se ha indicado que puede formar homo y heterodímeros al interaccionar con *TBX18* (Farin *et al.*, 2007).

Respecto a la regulación transcripcional del gen *TBX15*, sólo existe un trabajo que indica que la metilación de las islas CpG situadas en su región distal reguladora modula la expresión de *TBX15*. Este trabajo, realizado en placentas humanas, sugiere que tanto factores genéticos como epigenéticos intervienen en la regulación de *TBX15* (Chelbi *et al.*, 2011). Además, tal y como se comentó en el apartado anterior, la metilación diferencial de *TBX15* en el cáncer de próstata sugiere una posible implicación de *TBX15* en cáncer (Kron *et al.*, 2012).

4. El factor de transcripción YY1

El factor de transcripción Yin Yang 1 (YY1) es una proteína nuclear multifuncional que puede actuar como represora o activadora. Fue identificada en 1991 como una proteína que reprimía la actividad de promotor adenoviral P5 en ausencia de la oncoproteína E1A, mientras que era capaz de activar al promotor en presencia de E1A (Shi *et al.*, 1991). Inspirándose en esta actividad dual a nivel transcripcional, Shi y colaboradores (1997) denominaron a este factor “Ying Yang 1”, del chino “Yin” por represión y “Yang” por activación.

El gen que transcribe para este factor de transcripción es un miembro de la familia Polcomb, un grupo de genes homeobox que juegan un papel importante en la hematopoyesis y en el control del ciclo celular. El gen *YY1* se encuentra altamente conservado entre las diferentes especies, localizándose en humanos en la región del cromosoma 14 q32.2 (Yao *et al.*, 1998). Formado por 5 exones, la estructura de *YY1* fue revisada en 2006 por Gordon y colaboradores que describieron ocho transcritos de *YY1* generados por *splicing* alternativo que codificaban para un supuesto de ocho isoformas proteicas. A día de hoy, fruto de actualizaciones continuas que se recogen en las bases de datos se definen seis transcritos de *YY1* y cuatro productos proteicos (www.ensembl.org), tal y como se muestra en la Figura 5,

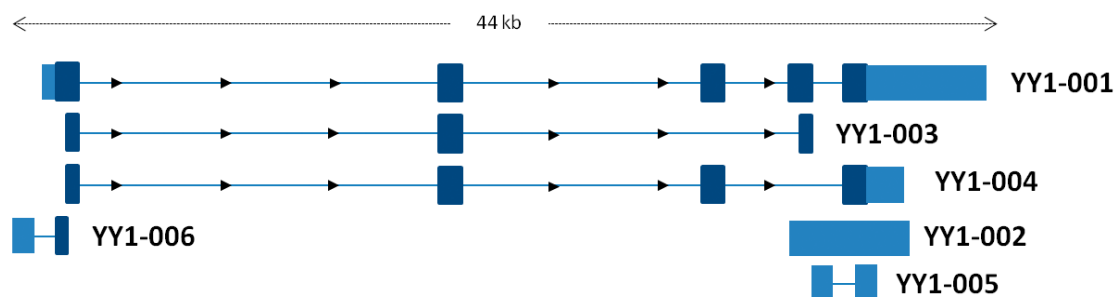


Figura 5. Esquema de los diferentes transcritos del gen *YY1*. Cada uno de los bloques azules representa un exón que se encuentra en el RNA mensajero, en azul oscuro se indican las secuencias que se traducirán a proteína.

El factor de transcripción YY1 humano se compone de 414 aminoácidos con un peso molecular de 44 kDa, donde quedan claramente diferenciados los dominios funcionales de activación y represión. Tal y como muestra la Figura 6, YY1 presenta

cuatro dedos de zinc de tipo C2H2 en su extremo C-terminal (aminoácidos 295-414) responsables de la unión específica a la secuencia de DNA consenso de reconocimiento 5'-(C/g/a)(G/t)(C/t/a)CATN(T/a)(T/g/c)-3', presente en los promotores de los genes que regula (Hyde-DeRuyscher *et al.*, 1995). La región N-terminal contiene una zona rica en histidinas flanqueada por aminoácidos de carácter ácido que funciona como dominio de activación transcripcional. En el centro de la molécula se encuentra una región rica en lisinas y glicinas (aminoácidos 170-200) que corresponde al dominio de interacción con la histona desacetilasa (HDAC) y que, junto al extremo C-terminal, forma el dominio de represión transcripcional (Yao *et al.*, 2001). Además, se identifica una región central adicional PHR (aminoácidos 205-226) que es la responsable del reclutamiento de proteínas homeobox (Luke *et al.*, 2006).

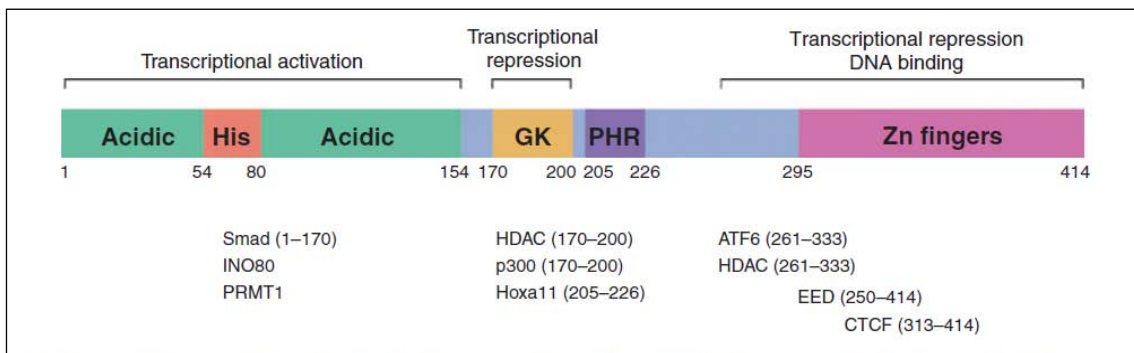


Figura 6.- Diagrama esquemático de los dominios funcionales de la proteína humana YY1 y los sitios de unión de alguno de sus ligandos conocidos. Se indican sus dominios de activación y represión transcripcional, además del de unión al DNA. La proteína/complejo asociado a YY1 se indica debajo de cada región de interacción, entre paréntesis aparecen los residuos involucrados en cada interacción. (His, dominio rico en histidinas; GK, dominio rico en glicinas y lisinas; PHR, región homóloga a la proteína PcG de *Drosophila* PHO) (Tomada de He *et al.*, 2008).

La proteína YY1 muestra gran similitud entre las especies, la identidad en la secuencia aminoacídica es del 98,8% entre humanos y ratones, y del 90,3% entre humanos y *Xenopus*. Se expresa de manera ubicua en diferentes tejidos humanos incluyendo cerebro, corazón, pulmón y sistema inmune. Como se ha indicado anteriormente, YY1 actúa como activador o represor y juega un papel importante en la regulación de muchos genes y vías de señalización fundamentales. La acción de YY1, activadora o represora, en los genes que regula depende del entorno celular y de su concentración relativa a otros componentes celulares. La predicción del número de genes regulados por YY1 es numerosa; así, en bases de datos de promotores

eucariotas se detectan hasta 1664 sitios potenciales de unión de YY1 (Hyde-Deruysscher *et al.*, 1995). Además, se ha descrito que YY1 actúa como una proteína iniciadora de la transcripción ya que, en ausencia de la proteína de unión a la caja TATA (TBP), el factor TFIIB y la RNA polimerasa II junto con YY1 puede iniciar de manera correcta la transcripción de un DNA superenrollado *in vitro* (Uscheva *et al.*, 1994).

Respecto al modo de acción de YY1 en la regulación génica, la interacción de YY1 con la secuencia consenso que reconoce en el DNA indica su acción directa sobre los genes que regula. Además, se ha indicado que YY1 puede actuar como cofactor, independiente de la unión al DNA, mediante la interacción con otros factores (ver Figura 7). Por ejemplo, en células de cáncer de próstata, la expresión del antígeno específico de próstata (PSA) depende de la expresión de *YY1*; sin embargo, al mutar la secuencia consenso reconocida por YY1 en el promotor de PSA, la transcripción no se ve alterada porque la expresión de PSA depende de YY1 se debe a que YY1 interacciona directamente con el receptor de andrógenos (AR) permitiendo, así, la unión de dicho receptor al promotor de PSA. (Deng *et al.*, 2009). Asimismo, se han descrito otras posibilidades de acción de YY1 como activador (directamente sobre la maquinaria basal de la transcripción, inhibiendo acciones represoras de otros factores, reclutando coactivadores,...) o como represor (directamente, desplazando factores activadores, interfiriendo en la función de los activadores, reclutando correpresores,...).

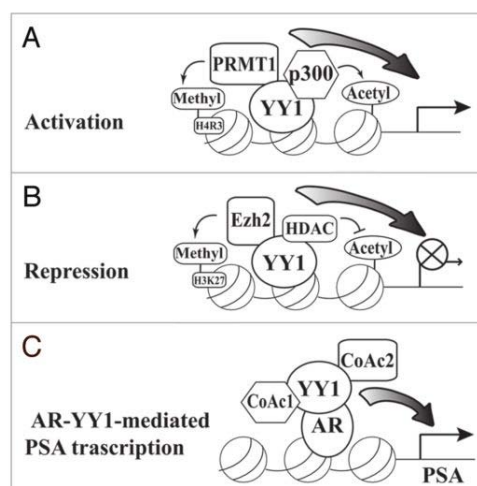


Figura 7. Esquema de los modelos de la regulación de YY1 sobre la transcripción génica. YY1 puede actuar como activador (A), represor (B) o coactivador (C, con el promotor de PSA como ejemplo). (Tomada de Deng *et al.*, 2009)

Los genes regulados por YY1 intervienen en importantes procesos celulares, como la citocinesis, la apoptosis, el desarrollo y diferenciación celular, muchos de ellos son genes constitutivos y reguladores del ciclo celular (Gordon *et al.*, 2006).

En ratón la delección de *YY1* en homocigosis *YY1^{-/-}* produce letalidad embrionaria y los ratones heterocigotos presentan retraso en el crecimiento y defectos en la formación y cierre del tubo neural (Donohoe *et al.*, 1999), lo cual indica el papel fundamental de YY1. En humanos no se conocen alteraciones del gen *YY1* ni síndromes asociados con la deficiencia de *YY1*, lo que sugiere que su función es imprescindible para la viabilidad. A nivel celular, niveles bajos de YY1 reducen el crecimiento y su eliminación lleva al fallo de la citocinesis (Affar *et al.*, 2006) pero, a pesar de esta fuerte relación entre YY1 y la proliferación celular, el efecto de la dosis aún está por aclarar. Se han identificado muchos reguladores del ciclo celular que se encuentran modulados por YY1, como c-Myc, RB o p53 (Figura 8). Además, se ha sugerido que YY1 puede tener una función esencial en la diferenciación celular estimulada por TGF- β 1 y otros factores nucleares, ya que es capaz de interaccionar y reprimir la actividad transcripcional específica de Smad (Kurisaki *et al.*, 2003).

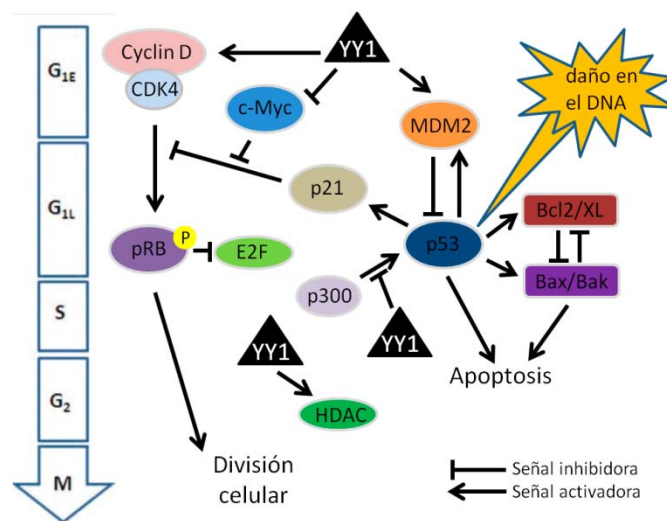


Figura 8. Interacción de YY1 con varios reguladores del ciclo celular. (Modificada de Zaravinos *et al.*, 2010)

YY1 también puede activar la reparación del DNA. Células HeLa transformadas para sobreexpresar YY1 y tratadas con un agente que provoca la parada del ciclo celular, muestran mayor estimulación de la polimerasa poli-ADP-ribosa 1 (PARP-1)

(Oei y Shi, 2001). La inactivación de YY1 en ratón resulta en poliploidía y aberraciones de la cromatina, resultado de defectos en la recombinación homóloga debido a que YY1 forma parte del complejo remodelador de la cromatina INO80; de hecho, estudios funcionales muestran que YY1 e INO80 son esenciales para la reparación del DNA basada en la recombinación homóloga (Wu *et al.*, 2007).

4.1 El factor de transcripción YY1 en cáncer

Como se ha indicado, YY1 interviene en procesos celulares fundamentales y muchos de estos procesos están relacionados con el cáncer; además, la expresión de YY1 se muestra alterada en muchos tipos de cáncer. Todo ello refuerza la hipótesis de su implicación e importancia en el desarrollo y progresión tumoral (revisión de Castellano *et al.*, 2009). También se ha demostrado que YY1 regula directamente genes implicados en cáncer como *c-Myc*, *c-Fos*, *E1A*, *p53* o *ERB-b2*, y actúa como cofactor interaccionando con otras proteínas que intervienen en la proliferación y la apoptosis, como p53, Mdm2, Ezh2, caspasas o HDACs (revisión de Zhang *et al.*, 2011).

Un ejemplo de la función múltiple de YY1 interviniendo en diferentes vías que conllevan a procesos cancerígenos es su efecto antagónico sobre p53 mediante: la promoción de su ubiquitinación y degradación, bloqueando la acetilación de la proteína p53, atenuando la estabilidad de p53 mediada por p14^{ARF} e inhibiendo la transcripción activada por p53 (Sui, 2004 y Figura 9). Estos múltiples y negativos efectos de YY1 sobre la estabilidad y función de p53, en los casos en los que YY1 se encuentra sobreexpresado en cáncer, hace pensar en la posibilidad de que p53 sea una de las primeras dianas de YY1 y sugiere un papel oncogénico o proliferativo de YY1 en el desarrollo oncogénico.

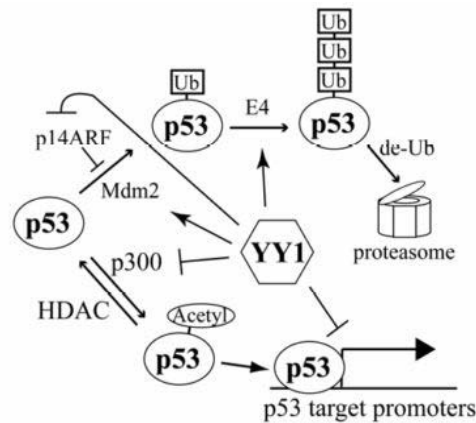


Figure 9. Modelo esquemático de los múltiples mecanismos por los que YY1 antagoniza a p53. YY1 inhibe la acetilación de la proteína p53 mediada por p300, lo cual inestabiliza la unión de p53 al DNA. YY1 también promueve la ubiquitinación mediada por Mdm2, la poliubiquitinación de p53, así como la estabilización de p53 mediada por p14^{ARF}. Además, YY1 inhibe la transcripción de los genes diana de p53, como p21. (Tomada de Sui, 2004)

La importancia de YY1 en procesos cancerígenos es evidente, aunque sus efectos presentan algunas contradicciones. Los estudios en tumores óseos llevados a cabo por de Nigris y colaboradores (2008) muestran que, en general, la sobreexpresión de *YY1* tiende a activar la tumorigenesis y que está asociada con la malignidad del tumor. Por otro lado, la eliminación de YY1 reduce la invasión celular y la metástasis de manera significativa. En este caso, YY1 inhibe genes supresores de tumores y promueve la expresión de oncogenes. Sin embargo, existen ejemplos en los que la expresión de *YY1* se relaciona positivamente con la expresión de genes supresores de tumores, dificultando el proceso oncogénico. Así, Wang *et al.* (2007) describen cómo la sobreexpresión de *YY1*, junto con *AP-1*, promueve y aumenta la transcripción del supresor de tumores *HLJ-1*.

La función dual de YY1 se refleja asimismo cuando se estudia su expresión en diferentes tipos de cáncer. La mayoría de estudios muestran que *YY1* se sobreexpresa y afecta al comportamiento clínico en varios tipos de tumores, como queda reflejado en la recopilación bibliográfica recogida en la Tabla 3. Así, se muestran unos niveles de mRNA o proteína YY1 aumentados en cánceres de próstata, colon, ovario, mama, hueso, hígado, pulmón, vesícula, cérvix, piel y de tipo hematopoiético. Además, en muchos casos, los niveles de YY1 se encuentran más elevados en los procesos metastáticos que en el tumor primario, revelando la importancia de YY1 en el desarrollo del tumor. Los niveles de YY1 mucho más altos en

algunas células cancerígenas podrían ser debidos a la desregulación de la transcripción de *YY1*. Por otro lado, en algunos tipos de tumores, cómo en melanomas y adenocarcinomas, las tasas de transcripción de *YY1* se ven significativamente disminuidas al compararlas con los tejidos normales (Revisado por Zaravinos *et al.*, 2010 y Zhang *et al.*, 2011). Estos resultados apoyan el papel dual de *YY1* en el desarrollo del cáncer, estando infra o sobreexpresado dependiendo del tipo de tumor.

Tabla 3. Significado clínico de la sobreexpresión de *YY1* en algunos tipos de cáncer.

Tipo de tumor (nº de casos)	Método de análisis	Relevancia clínica de la sobreexpresión de <i>YY1</i>	Referencias
Cáncer de próstata (190)	IHC	Relación con metástasis.	Seligson et al. 2005
Cáncer de ovario (65)	Microarray	Relación con supervivencia.	Berchuck et al. 2005
Cáncer de ovario (88)	Microarray, qPCR, IHC	Relación con supervivencia y respuesta a taxano.	Matsumura et al. 2009
Cáncer de mama (55)	IHC	Relación con sobreexpresión de ERBB2.	Allouche et al. 2008
Neoplasma cervical (22)	qPCR	Relación con la progresión del cáncer.	Baritaki et al. 2007
Osteosarcoma (19)	qPCR, IHC, WB	Relación con fenotipos histológicos malignos.	de Nigris et al. 2006
Leucemia mieloide (126)	qPCR	Relación con la traslocación t(8;21).	Grubach et al. 2008
Linfoma de Hodgkin (54)	IHC	-	Dukers et al. 2004
Linfoma no Hodgkin (96)	qPCR	Relación con mal pronóstico.	Sakhinia et al. 2007
Linfoma no Hodgkin (796)	Análisis computacional	Relación con fenotipo maligno y mal pronóstico.	Libra et al. 2008
Linfoma no Hodgkin (104)	WB, IHC	Relación con fenotipo maligno y mal pronóstico.	Libra et al. 2008

IHC: inmunohistoquímica; qPCR: PCR cuantitativa; WB: *Western Blot*

En resumen, *YY1* es un regulador clave de múltiples vías de señalización relacionadas en el desarrollo del cáncer. A pesar de que en melanomas hay una disminución de *YY1*, la idea general es que *YY1* actúa como un oncogén en la mayoría de los tipos de cáncer. Esta afirmación se basa en las siguientes premisas: (i) *YY1* es capaz de activar a oncogenes bien caracterizados como *c-Myc*, *c-Fos*, *B23* y

ERBB2; (ii) YY1 recluta y proporciona la plataforma para la actuación de ciertas proteínas que provocan alteraciones epigenéticas en el cáncer, tales como Ezh2, PRMT1, p300, HDACs y DNMTs; (iii) YY1 antagoniza las funciones de importantes genes supresores de tumor, como *p53* y *p14^{ARF}*; (iv) la expresión y función de *YY1* son estimuladas por señales proliferativas u oncogénicas, como factores de crecimiento y AKT; (v) *YY1* es antagonizado por varios supresores de tumores (como PTEN, Rb y algunos miRs) y estímulos apoptóticos; y (vi) *YY1* se encuentra sobreexpresado en muchos tipos de cáncer, su promotor presenta estructuras de tipo G4 que típicamente están presentes en los promotores de oncogenes.

5. Factores de transcripción en la genética del cáncer de tiroides

En apartados anteriores se ha indicado la relevancia de ciertos factores de transcripción en la genética del cáncer, incluyendo los genes de la familia T-box e *YY1*. Los factores de transcripción en cáncer actúan como oncogenes o genes supresores de tumores y su expresión se encuentra alterada en muchos tipos de cáncer, indicando que muchos de estos factores de transcripción intervienen en procesos celulares comunes en distintos tejidos.

En este apartado trataremos de abordar los principales factores de transcripción que se ven alterados de forma específica en el cáncer de tiroides, enfermedad que fue el punto de origen para este trabajo de tesis, ya que la información acerca de la implicación de los factores de transcripción de procesos celulares comunes, en cáncer de tiroides es muy escasa o inexistente.

Para el correcto desarrollo y el mantenimiento del estado diferenciado funcional de la glándula tiroides en adultos es necesaria la expresión simultánea de cuatro factores de transcripción: NKX2-1 (o TTF1), FOXE1 (o TTF2), PAX8 y HHEX. Estos factores se expresan en las células foliculares del tiroides e intervienen en la diferenciación, proliferación y apoptosis de la glándula tiroides. En adultos, la expresión conjunta de estos factores mantiene el fenotipo diferenciado del tiroides (Revisado por Fernández *et al.*, 2015). También se expresan en otros tejidos en humanos, pero de forma independiente.

Mutaciones en los genes *NKX2-1*, *FOXE1* y *PAX8* se han asociado con ciertas patologías del tiroides en humanos (Nettore *et al.*, 2013) y existen estudios que indican también su asociación con el cáncer de tiroides. En la Tabla 4 se indican las alteraciones genéticas y expresión de los factores de transcripción específicos del tiroides en el cáncer de tiroides.

Tabla 4. Patrones de expresión y alteraciones genéticas de factores de transcripción específicos del tiroides en el cáncer de tiroides.

Factor de transcripción	Cáncer de tiroides			Alteraciones en otros cánceres
	Niveles de expresión	Alteraciones genéticas	Predisposición	
NKX2-1	Expresión correlacionada con nivel de desdiferenciación. (PTC>FTC>ATC)	rs944289 Mutación germinal sin sentido	PTC y FTC PTC	Expresión aumentada en adenocarcinomas de pulmón.
FOXE1	Expresión correlacionada con nivel de desdiferenciación. (PTC>FTC>ATC)	rs95513 rs1867277	PTC	Pérdida de heterocigosidad, metilación de su promotor en SCC.
PAX8	Datos contradictorios	<i>PAX8-PPARγ</i> Epistasis con STK17B	FTC	Expresión elevada en neoplasias renales, ováricas, tumor de Wilms.
HHEX	En tipo anaplásico deslocalizado en el citoplasma.	-	-	Pérdida de localización nuclear y/o pérdida de funcionalidad en AML y CML.

AML: leucemia mieloide aguda; ATC: cáncer de tiroides tipo anaplásico; CML: leucemia mieloide crónica; FTC: cáncer de tiroides tipo folicular; PTC: cáncer de tiroides tipo papilar; SCC: carcinoma de células escamosas. (Tabla modificada de Fernández *et al.*, 2015)

En cáncer de tiroides la expresión del factor de transcripción NKX2-1 disminuye a medida que aumenta el estado de desdiferenciación, siendo los tumores anaplásicos los que presentan la expresión menor. Además, se ha definido la asociación de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) situado en la región 14q13.3 (zona muy cercana al gen *NKX2-1*) con cáncer de tiroides de tipo papilar y folicular (Gudmundsson *et al.*, 2009); y una mutación germinal, que provoca un cambio de aminoácido en el dominio de transactivación de NKX2-1, se ha encontrado en el

cáncer de tiroides de tipo papilar y en pacientes con gota de tipo multinodular (Ngan *et al.*, 2009). NKX2-1 se utiliza como un marcador de diagnóstico y pronóstico en cáncer de pulmón (Yang *et al.*, 2012) y manifiesta función opuesta, oncogénica o supresora de tumores, en diferentes tipos de cáncer (Mu, 2013).

El factor de transcripción FOXE1 ha sido ampliamente caracterizado como un gen de susceptibilidad para el cáncer de tiroides (Gudmundsson *et al.*, 2009; Landa *et al.*, 2009). Asimismo, la expresión de *FOXE1* sigue un patrón similar al de *NKX2-1*, mostrando una correlación inversa con el grado de dediferenciación del tumor, siendo el cáncer de tiroides anaplásico el que presenta menor nivel de FOXE1 (Bychkov *et al.*, 2013). Alteraciones de *FOXE1* se han relacionado con el desarrollo del cáncer de células escamosas (Venza *et al.*, 2010), y la metilación del promotor de *FOXE1* se ha asociado con el cáncer de páncreas y el de células escamosas (Brune K *et al.*, 2008; Venza *et al.*, 2010).

La translocación que conlleva a la fusión génica *PAX8-PPAR γ* se encuentra en el 36% de los cánceres de tiroides de tipo folicular, alteración que se considera oncogénica y específica de etapas tempranas de este tipo de cáncer (Kroll *et al.*, 2000). La proteína de fusión resultante, que presenta el dominio de unión al DNA de PAX8, hipotéticamente es capaz de reducir la apoptosis y promover la proliferación celular (Placzkowski *et al.*, 2008). Además, se ha descrito una interacción epistásica entre *PAX8* y *STK17B* (gen regulador de la apoptosis) (Landa *et al.*, 2013). Los niveles de PAX8 en cáncer de riñón y ovario se encuentran aumentados, pero en cáncer de tiroides, el patrón de expresión no está claro, siendo los resultados contradictorios (Zang *et al.*, 2006; Nonaka *et al.*, 2008).

El factor HHEX se expresa en carcinomas de tiroides de tipo anaplásico encontrándose deslocalizado en el citoplasma (D'Elia *et al.*, 2002). Esta localización aberrante se atribuye al mecanismo que controla la funcionalidad de HHEX. De hecho, en otros tipos de cáncer, como en algunas leucemias, también se ha observado la ausencia de HHEX en el núcleo, con la consiguiente pérdida de función (Puppini *et al.*, 2006; Jankovic *et al.*, 2008)



OBJETIVOS

OBJETIVOS

Tal y como se introdujo en el apartado anterior, estudios de asociación en cáncer de tiroides realizados en nuestro laboratorio nos situó ante la hipótesis de que dos factores de transcripción, el TBX15 y el YY1, contribuyen al desarrollo de características celulares asociadas al cáncer.

Así, el objetivo principal de esta tesis doctoral consiste en caracterizar el papel de los factores de transcripción TBX15 e YY1 en el cáncer. Para ello, nos planteamos una serie de objetivos específicos:

- Determinar la expresión de TBX15 en líneas celulares.
- Estudiar la función de TBX15 en procesos celulares relacionados con el desarrollo del cáncer.
- Analizar los factores que regulan la expresión del gen *TBX15*.
- Caracterizar la expresión de YY1 en líneas celulares y muestras de tejidos normales y tumorales de tiroides.



MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se hace una descripción extensa y detallada de los materiales y métodos utilizados durante todo el trabajo de tesis, que en los artículos se presentan de manera resumida.

1. Material biológico

1.1. Líneas de celulares y medios de cultivo

Para la realización de este trabajo se utilizaron nueve líneas celulares de cáncer de tiroides (dos derivadas de tipo papilar: TPC-1 y B-CPAP; tres de tipo folicular: ML1, WRO y CGTH; y cuatro de tipo anaplásico: FRO, 8305C, 8505C y CAL). Como referencia de células normales se utilizaron dos líneas celulares primarias de tiroides: S11N y S63N. También se utilizó la línea celular HeLa de cáncer de cérvix.

En los experimentos de transfección se utilizó como aceptora la línea celular HEK293, derivada de cáncer embrionario de riñón.

Además de las líneas celulares de origen humano anteriormente citadas, se utilizaron dos líneas de fibroblastos embrionarios de ratón, una de ellas con el gen p65 inactivo (MEF p65^{-/-}) y su correspondiente control (MEF p65^{+/+}).

Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera 5% CO₂. El origen y condiciones de cultivo de cada línea celular se describen en la Tabla 5.

Tabla 5. Líneas celulares utilizadas en este trabajo y condiciones de cultivo.

Línea celular	Tipo de cáncer	Fuente	Condiciones de cultivo	Primera referencia
S11N	Normal	Dr. L. Hieber	RPMI 1640, 20%FCS, 2.5ug Plasmocin™	
S63N	Normal	Dr. L. Hieber	RPMI 1640, 20%FCS, 2.5ug Plasmocin™	
TPC-1	Tiroideo Papilar	Dr. Melillo y Santoro	DMEM 10%FCS, 2.5ug Plasmocin™	Tanaka et al., 1987
B-CPAP	Tiroideo Papilar	DSMZ	RPMI 1640, 10%FCS, 2.5ug Plasmocin™	Fabien et al., 1994
ML1	Tiroideo Folicular	DSMZ	DMEM 10%FCS, 2.5ug Plasmocin™	Schönberger et al., 2000
WRO82-1	Tiroideo Folicular	Dr. Ciampi	RPMI 1640, 10%FCS, 1%neAA, 1%NaPyr, 2.5ug Plasmocin™	Estour et al., 1989
CGTH W-1	Tiroideo Folicular	DSMZ	RPMI 1640, 10%FCS, 2.5ug Plasmocin™	Lin et al., 1995
FRO81-2	Tiroideo Anaplásico	Dr. Ciampi	RPMI 1640, 10%FCS, 1%neAA, 1%NaPyr, 2.5ug Plasmocin™	Nishihara et al., 1997
8305C	Tiroideo Anaplásico	DSMZ	RPMI 1640, 10%FCS, 2.5ug Plasmocin™	Ito et al., 1992
8505C	Tiroideo Anaplásico	DSMZ	RPMI 1640, 10%FCS, 2.5ug Plasmocin™	Ito et al., 1992
CAL-62	Tiroideo Anaplásico	Dr. Melillo y Santoro	DMEM 10%FCS, 2.5ug Plasmocin™	Gioanni et al., 1991
HEK293T	Riñón	Dr. F. Rosselli	DMEM 10%FCS, 2.5ug Plasmocin™	Graham et al., 1977
HeLa	Cérvix	CNIO	DMEM 10%FCS, 2.5ug Plasmocin™	Gey et al., 1952
MEF WT	Fibroblasto embrionario de ratón	Dr. Leonardi	DMEM 10%FCS, 2.5ug Plasmocin™	
MEF p65 ^{-/-}	Fibroblasto embrionario de ratón	Dr. Leonardi	DMEM 10%FCS, 2.5ug Plasmocin™	

WT: tipo salvaje; DSMZ: Leibniz Institute, (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares); CNIO: Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid; FCS: suero fetal bovino; neAA: aminoácidos no esenciales; NaPyr: piruvato sódico.

1.2. Muestras de tejido tiroideo humano

Se utilizaron muestras de tejido tiroideo humano que, sin previo procesamiento, se congelaron para el posterior análisis en estudios de expresión a nivel de RNA mensajero. También se utilizaron muestras de tejido humano conservadas en parafina para la construcción de *microarrays* de tejido (TMAs, *tissue microarrays*), analizando la expresión a nivel de proteína.

1.2.1. Muestras congeladas

Para los estudios de expresión a nivel de mRNA se analizaron muestras pareadas normal/tumor de cáncer de tiroides que se obtuvieron de la Red de Bancos de Tumores de Cataluña (*Xarxa de Bancs de Tumors de Catalunya*, XBTC). Ocho de los 15 tumores se clasificaron como carcinoma papilar de tiroides (PTC), tres como carcinoma folicular de tiroides (FTC) y los cuatro restantes como adenomas foliculares (FA). Las muestras congeladas se conservaron a -80°C hasta su procesamiento y análisis posterior.

1.2.2. *Microarrays* de tejidos (TMAs)

Los TMAs fueron contruidos a partir de biopsias conservadas en parafina de muestras quirúrgicas del Departamento de Patología del Hospital de la Vall d'Hebrón. Se incluyeron un total de 86 pacientes de cáncer de tiroides (26 hombres y 60 mujeres) sometidos a tratamiento para este tipo de cáncer entre los años 1978 y 1998, con una media de edad de 41.2 ± 18.4 años. A todos estos pacientes se les hizo un seguimiento médico con revisiones periódicas durante 19 ± 8 años desde el inicio de su tratamiento. Los tumores tiroideos de los pacientes fueron clasificados en función de su histología, en folicular (FTC, 21 pacientes) o papilar (PTC, 65 pacientes). Los TMAs se montaron siguiendo el método estándar que, en resumen, consistió en seleccionar áreas representativas del tumor después de la tinción con hematoxilina-eosina de los bloques individuales de parafina. Como mínimo, 3 secciones de 1.5 mm de diámetro fueron obtenidas de cada una de las muestras de los pacientes y organizadas en un nuevo bloque de parafina. En total, se obtuvieron 10 TMAs con 10 casos por cada TMA. Finalmente, se

realizaron secciones de $3\mu\text{m}$ de los bloques y se fijaron en portaobjetos aptos para el análisis por inmunohistoquímica.

1.3. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados en este trabajo y sus condiciones de uso se describen en la tabla presentada a continuación (Tabla 6).

Tabla 6. Anticuerpos utilizados en este trabajo y sus características.

	Concentración	Origen	Tipo	Referencia	Casa comercial
<i>Western blot</i>					
α -TBX15	1:100	conejo	IgG T-24 policlonal	sc134059	Santa Cruz Biotech
α -YY1	1:5000	conejo	IgG C-20 policlonal	sc-281	Santa Cruz Biotech
α -NFKB P65	1:1000	cabra	IgG C-20 policlonal	sc-372-G	Santa Cruz Biotech
α -PARP	1:1000	ratón	IgG 6D640 monoclonal	sc71849	Santa Cruz Biotech
α -Caspase3	1:1000	conejo	IgG policlonal	ab47131	Abcam
α -Caspase9	1:1000	conejo	IgG monoclonal	ab185719	Abcam
α -Cytochrome	1:1000	ratón	IgG monoclonal	ab110325	Abcam
α -Bax	1:1000	ratón	IgG monoclonal	ab77566	Abcam
α -Bcl2	1:1000	ratón	IgG monoclonal	ab77567	Abcam
α -Bcl XL	1:1000	conejo	IgG monoclonal	ab32370	Abcam
α -Vinculin	1:2500	conejo	IgG N-terminal policlonal	ab82418	Abcam
<i>Inmunohistoquímica</i>					
α -YY1	1:40	ratón	IgG 2C4 monoclonal	WH0007528M1	Sigma
<i>Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)</i>					
α -NFKB P65	4 μg	cabra	IgG C-20 policlonal	sc-372-G	Santa Cruz Biotech
α -IgG1	4 μg	ratón	IgG clon MOPC21	M5284	Sigma

1.4. Cebadores

Las secuencias de los cebadores utilizados en este trabajo y sus temperaturas de hibridación se especifican en la Tabla 7.

Tabla 7. Cebadores utilizados en los distintos ensayos realizados en este trabajo.

Secuencia (5' a 3')		T _a (°C)
PCR cuantitativa		
TBX15	FW: AAAGCAGGCAGGAGGATGTT RV: GCACAGGGGAATCAGCATTG	58
YY1	FW: GACCTCTCAGATCCCAAA RV: TTGTTTTGGCCTTAGCA	58
CXCL1	FW: AACCGAAGTCATAGCCACAC RV: CCTCCCTTCTGGTCAGTTG	58
RPL27	FW: ATCGCCAAGAGATCAAAGATAA RV: TCTGAAGACATCCTTATTGACG	58
mCXCL1 (ratón)	FW: AACCGAAGTCATAGCCACAC RV: TTGGGGACACCTTTTAGCAT	58
mRPL27 (ratón)	FW: ATCGCCAAGCGATCCAAGATCA RV: CCTGAACACATCCTTGTGACA	58
Generación de las construcciones para los ensayos de luciferasa		
P1	FW: ATTCCTCT GAGCTCT CCCAAGTTACGCCACC RV: GCTTT GGTACCGT CACAAATATAAAATCGGGGCTTC	68
P2	FW: TCGA AGGTACCGG AATGTGAGGTCAACGAT RV: GCTTT AGATCTGT CACAAATATAAAATCGGGGCTTC	65
P2rev	FW: TCGA AAAGATCTGGG AATGTGAGGTCAACGAT RV: GCTTT GGTACCGT CACAAATATAAAATCGGGGCTTC	65
P4	FW: TCGA AGGTACCGG AATGTGAGGTCAACGAT RV: CCTCT AGATCTAAT GCCGATAGAACGCAGAT	65
P5	FW: GCAG CGGTACC ATCCCTTGGTCCTTCCAGAT RV: GCTCC AGATCTG ACCGAAGTCAGCGAACAAT	65
Generación de mutaciones puntuales en construcciones analizados por luciferasa		
kBS1	FW: CAAGAGGAGAGCGAAAAGGGGG TACCG CCCCGATTTTATATTTGTGACT RV: AGTCACAAATATAAAATCGGGG GGTAC CCCCCTTTTCGCTCTCCTCTTG	60
kBS2	FW: ACCAGCAGCGTGCCCATCCCTT GTGA ATCCAGATGTTTGCAATAAAATCG RV: CGATTTTATTGCAAACATCTGGA ATTC CAAGGGATGGGCACGCTGCTGGT	60
kBS3	FW: GGGAGAGGGAGTGGATTCTGGAAA GCTTC GCCCAAGGCCAG RV: CTGGCCTTGGG CGAAGCT TTCCAGAAATCCACTCCCTCTCCC	60
Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)		
región kBS1	FW: TATCGGCATTGGGGCAAGAG RV: CAGACCGAAGTCAGCGAACA	58
región kBS2	FW: ATTCAAGCACCCCTCACAC RV: CTGGAAGGACCAAGGGATGG	58
región kBS3	FW: GTGAGATGGGGAGAGGGAGT RV: GTGTGAGGGGGTGCTTGAAT	58
Promotor Ciclina D1	FW: TCCCATTCTCTGCCGGGCTTTGATC RV: GCTGGTGTCCATGGCTGGGGC	58
Amplificación de las muestras de DNA modificadas con bisulfito		
C1	FW: TTTATAAAGGGAGTTTTGTGTGGT RV: TAAAACAACTCCTCCCTCATACTC	59
C2	FW: TTTAGTTTGTTTTTATAAATTTATTTG RV: AACAAAATTCCTCACCTCTAAAC	53

En negrita se indican las dianas de reconocimiento de las enzimas de restricción para la generación de los constructos de luciferasa y, también los nucleótidos cambiados en la generación de mutaciones puntuales. FW: cebador sentido (*forward*); RV: cebador antisentido (*revers*); Ta: temperatura de hibridación.

2. Métodos experimentales

2.1. Extracción y purificación de DNA

El DNA se extrajo siguiendo el protocolo estándar que se basa en la separación por fenol-cloroformo y su precipitación en acetato de amonio-etanol. El DNA se cuantificó mediante el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) y se guardó a -20°C hasta su posterior análisis o manipulación. Los fragmentos de DNA que se separaron por electroforesis y el DNA amplificado por PCR, se purificaron utilizando el kit NucleoSpin Extract II (Masherey Nagel).

2.2. Extracción de RNA

La extracción del RNA total de las células en cultivo se realizó siguiendo el protocolo que indica el reactivo TRIzol® (Ambion, Life Technologies™). Para la obtención del RNA a partir de las muestras de tejidos, se utilizó el kit AllPrep® DNA/RNA/Protein (Qiagen). El RNA se cuantificó mediante el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) y se guardó a -80°C hasta su posterior análisis.

2.3. Retrotranscripción

La síntesis de cDNA se realizó utilizando el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis (Roche), partiendo de un microgramo de RNA total y siguiendo las directrices del fabricante. El cDNA obtenido se guardó a -20°C hasta su posterior análisis.

2.4. PCR cuantitativa

La expresión génica fue analizada por PCR a tiempo real utilizando el reactivo LightCycler® 480 SYBRGreen I Master (Roche), siguiendo el protocolo del fabricante. Cada PCR cuantitativa se realizó de la siguiente manera: 5 min a 95°C, 45 ciclos a 95°C durante 10s, 58°C durante 15s, 72°C durante 25s, y 78°C durante 5s. La especificidad de la reacción se verificó mediante el análisis de la curva de disociación de cada fragmento amplificado con un ciclo de 5s a 95°C seguido por un incremento constante de temperatura entre 65 y 95°C. Las reacciones se llevaron a cabo en el

sistema LightCycler® 480 (Roche). La expresión relativa de los genes de interés se normalizó utilizando el gen constitutivo *RPL27* y se calculó siguiendo el método de la segunda derivada (*2nd Derivative Max Method*).

2.5. Modificación del DNA con bisulfito y secuenciación de los fragmentos de DNA amplificados

El DNA fue modificado con bisulfito sódico mediante el kit EZ DNA Methylation-Startup™ (Zymo Research, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguidamente, se amplificaron por PCR las regiones de interés para su posterior secuenciación. La reacción se realizó en un volumen total de 25µL con 50-100ng de DNA tratado con bisulfito, 1X ZymoTaq™ PreMix (Zymo Research, USA) y 1mM de cada cebador. Como control, se realizó una reacción con un DNA metilado estándar. En la amplificación se siguieron las siguientes condiciones: 95°C durante 10min; 40 ciclos a 95°C durante 35s, temperatura de hibridación durante 30s, y 72°C durante 1min; y como extensión final, 7min a 72°C. Los cebadores utilizados y sus temperaturas hibridación (T_a) se especifican en la Tabla 7. Los productos amplificados se separaron con un gel de agarosa, fueron purificados y, posteriormente, secuenciados utilizando el servicio de secuenciación de Macrogen. El análisis del estado de metilación se realizó y semicuantificó siguiendo la fórmula: %metilación = $100 \times n^{\circ}C / (n^{\circ}C + n^{\circ}T)$ tal y como describió Jiang y colaboradores en 2010. Los porcentajes se redondearon a 0%, 25%, 50%, 75% y 100%.

2.6. Extracción de proteínas y *western blot*

Los lisados celulares se prepararon en tampón RIPA (Millipore) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche). Para la eliminación de otros componentes celulares, las muestras se fragmentaron y sonicaron en 3 ciclos de 15s al 20% de amplitud. Después de su cuantificación, mediante el reactivo de Bradford, las proteínas se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis mediante *western blot*.

Para el análisis por *western blot* se separaron 30µg de proteína en un gel desnaturante al 9% de poliacrilamida, electrotransfiriéndose a membranas de nitrocelulosa (Trans-Blot® Transfer Medium, Bio-Rad). Las membranas se bloquearon

de manera rutinaria y se hibridaron con el anticuerpo correspondiente (mirar Tabla 6). Seguidamente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario asociado conjugado con peroxidasa (1:5000) durante 1h. El anticuerpo contra vinculina se utilizó como control de carga. Las señales de proteína se detectaron mediante quimioluminiscencia (Pierce® ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific) en la máquina GeneGnome® y fueron analizadas con la ayuda del programa ImageJ.

2.7. Inmunohistoquímica

La tinción inmunohistoquímica de los TMAs se realizó utilizando el sistema indirecto sin biotina con el kit de detección ultraView Universal DAB (Ventana Medical Systems), automatizado por el módulo de tinción Benchmark XT. Brevemente, la desparafinación se hizo con la solución EZ prep™ 10x y el desenmascaramiento con la solución, previamente diluida, Cell Conditioning 1 a pH 8 durante 1h. Seguidamente, el TMA se incubó durante 2h a 37°C con el anticuerpo para YY1. Las muestras fueron tratadas con un anticuerpo secundario y el revelado se realizó utilizando H₂O₂ como substrato y diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. La contratinción se realizó con hematoxilina durante 8min.

Para evaluar la tinción inmunohistoquímica de YY1 se tuvo en cuenta la intensidad de señal en los casos en los que se observaba tinción homogénea a nivel celular. Todas las muestras inmunohistoquímicas se analizaron y clasificaron en función de la intensidad de tinción a nivel nuclear en: 0, negativa o ausencia de células positivas; 1, suave; 2, moderada y 3, tinción fuerte. Para los estudios estadísticos, los casos con ausencia o tinción suave se consideraron como expresión negativa de YY1 y los casos con tinción moderada o fuerte se trataron como expresión positiva de YY1.

Esta técnica se desarrolló en el Departamento de Anatomía Patológica del hospital de la Vall d'Hebrón.

2.8. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

La inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se realizó, con algunas modificaciones, tal y como describen Nowak y colaboradores en 2005. El día anterior del experimento, 5x10⁶ células se sembraron en placas de 100mm de diámetro con

medio suplementado con 0.5% de albúmina (BSA). Las células se estimularon con 2000U/mL TNF α durante 30min, lavadas primeramente con PBS y, después, con PBS 1mM MgCl₂ a pH 8.0 (PBS/Mg). El entrecruzamiento del DNA a las proteínas se realizó en primer lugar con 2mM de disuccinimidil glutarato (DSG, Fisher Scientific) durante 45min. Al final de la fijación, las células se lavaron con PBS. Seguidamente, se realizó un segundo entrecruzamiento con una solución 1% (v/v) de formaldehído en PBS/Mg, incubando a temperatura ambiente durante 15min. Después de lavarlas, las células fueron recogidas y lisadas 15min en hielo con 100 μ L de tampón L1 (50mM Tris pH 8.0, 10mM EDTA, 0.1% IGEPAL 630, 10% glicerol, 1mM DTT con inhibidores de proteasas *cOmplete*, Roche). Para eliminar las proteínas citoplasmáticas se precipitaron los núcleos mediante centrifugación, resuspendiéndose en 500 μ L de tampón de lisis con SDS (1% SDS, 50mM Tris pH 8.0, 10mM EDTA). Las muestras fueron sonicadas en el sonicador Digital Branson Sonifier® (Branson Ultrasonics Danbury, USA) con ciclos de 30s de sonicación, 30s en hielo. El tamaño de los fragmentos de DNA (300-500bp) se verificó a partir de una alícuota de 20 μ L, de la cual se revertió el entrecruzamiento incubando a 65°C durante 2h en 200mM NaCl, 0.5% SDS y 200 μ g/mL proteinasa K. La extracción del DNA se realizó mediante el protocolo usual fenol-cloroformo y precipitación en acetato de amonio/etanol.

La cromatina soluble se cuantificó midiendo la absorbancia a 260nm, sin añadir más de 100 μ L de muestra en cada tubo, y tomando una cantidad de cromatina equivalente como *input*, se procedió a realizar la inmunoprecipitación. En primer lugar, se añadió tampón de baja carga iónica (50mM NaCl, 10mM HEPES pH 7.4, 1% IGEPAL 630, 10% glicerol, 1mM DTT con inhibidores de proteasa) hasta un volumen final de 900 μ L con 20 μ L de bolas magnéticas (Protein G Mag Sepharose Xtra, GE Healthcare Life Sciences), previamente lavadas y preequilibradas en presencia de tampón con 5% BSA. Cuatro microgramos de cada anticuerpo (NFKB p65 sc-372-G de Santa Cruz Biotechnology, y IgG1 Isotipo Control clon MOPC21 de Sigma) se prepararon en un volumen final de 500 μ L con tampón de baja carga iónica y 20 μ L de bolas magnéticas. Después de la incubación durante toda la noche a 4°C y en rotación, las muestras de bolas+anticuerpo se lavaron con el tampón de baja carga iónica y se les añadió la cromatina (reservando 10 μ L como input). Las hibridaciones se realizaron durante toda la noche a 4°C con rotación. Los complejos unidos a las bolas se seleccionaron con un rack magnético (MagRack 6, GE Healthcare Life Sciences), lavándose con 500 μ L de tampón de baja carga iónica. Seguidamente, las bolas se lavaron de manera secuencial tal como sigue: lavado con tampón de alta salinidad

(500mM NaCl, 0.1% SDS, 1% IGEPAL 630, 2mM EDTA, 20mM Tris pH 8.0), lavado con tampón con LiCl (0.25M LiCl, 1% IGEPAL 630, 1% deoxycholate, 1mM EDTA, 10mM Tris pH 8.0), y lavados con TE (10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA). Durante 30min y en rotación, se procedió a la elución de los complejos formados con 400µL de tampón de elución (1% SDS, 0.1M NaHCO₃).

Finalmente, se revirtió el entrecruzamiento de las muestras gracias a una solución de 200mM NaCl, 50mM Tris pH 6.8, 10mM EDTA y 200µg/mL proteinasa K a 65 °C, durante 2h30min, y, se extrajo el DNA para su posterior análisis por PCR cuantitativa.

3. Tratamientos y ensayos celulares

3.1. Tratamientos celulares

3.1.1. Tratamiento con camptotecina

Como agente inductor de apoptosis se utilizó la camptotecina (CPT), un fármaco citotóxico que inhibe la enzima topoisomerasa I generando daño en el DNA. La CPT se adquirió de la casa comercial Sigma y se preparó una solución stock a 10mM en DMSO. Después de 24h de la transfección celular con el vector de expresión correspondiente, el medio de cultivo se substituyó por uno con una concentración final de 10µM de CPT, o con medio fresco como control. A las 0, 24, 48 y 72h de tratamiento, se recolectaron las células para ser analizadas.

3.1.2. Estimulación con TNFα

Con el objetivo de activar la vía de señalización de los factores NFκB se utilizó la citoquina TNFα. El compuesto fue adquirido de Preprotech, diluido y alícuotado con medio de cultivo hasta obtener una solución stock de 10⁶U/mL. Las líneas celulares TPC-1, FRO, CGTH, HeLa, MEF p65^{+/+} y MEF p65^{-/-} se sembraron en placas de 6 pocillos (10⁵ células/pozo) con 2mL de su propio medio de cultivo. Cuando las células se adhirieron a las placas, el medio de cultivo se cambió por uno nuevo que contenía TNFα a una concentración final

de 2000U/mL, o medio fresco como control del tratamiento. A las 24h de estimulación, se extrajo el RNA de las células y fue analizado mediante PCR cuantitativa.

3.1.3. Tratamiento con 5-aza-2'-deoxicitidina

Con el objetivo de cuantificar el efecto de la metilación en la expresión de *TBX15* se realizó una desmetilación del DNA total celular, utilizándose el compuesto 5-aza-2'-deoxicitidina (5-aza-dC, Sigma-Aldrich). Se sembraron células TPC-1 en placas de 6 pocillos a una concentración de 10^5 células/pozo (alrededor del 20% de confluencia). Después de 24h, se añadió el agente desmetilante 5-aza-dC a unas concentraciones finales de $2\mu\text{M}$ y $5\mu\text{M}$. Las células se dejaron crecer durante 96h, renovando el reactivo 5-aza-dC cada 24h. Al quinto día de tratamiento con 5-aza-dC, las células se recolectaron para extraer su RNA y su posterior análisis mediante PCR cuantitativa.

3.2. Transfección celular

3.2.1. Transfección de plásmidos

Con el objetivo de estudiar la función de *TBX15* a nivel celular, se sobreexpresó este factor en diferentes líneas celulares. Células FRO y TPC-1 se sembraron en placas de 6 pocillos (2×10^5 células/pozo) en 2mL de su propio medio de cultivo y fueron transfectadas, al día siguiente, con el reactivo XtremeGene 9 (Roche) siguiendo el protocolo estándar del fabricante. Los plásmidos transfectados fueron: el vector de expresión pcDNA3.1-TBX15 y, como control, el vector vacío pcDNA3.1.

- el vector de expresión **TBX15.V** (pcDNA3.1-TBX15), que codifica para la totalidad del gen *TBX15*, fue transfectado a una concentración de $1\mu\text{g}$ DNA/pozo. Generosamente proporcionado por el Dr. Kispert, Hannover, Alemania.
- el vector vacío **pcDNA3.1** (EV), utilizado como control negativo en los ensayos de transfección, fue transfectado a una concentración de $1\mu\text{g}$ DNA/pozo.

Con el objetivo de estudiar la región reguladora de *TBX15*, se diseñaron una serie de constructos utilizando el plásmido **pGL4.26** (Promega) como base en la clonación de los diferentes fragmentos de la región reguladora del gen *TBX15* (los diferentes constructos están especificados en el apartado 1.2 de Resultados). Este vector codifica para el gen reportero luciferasa *luc2* (*Photinus pyralis*) y contiene una región de policlonaje donde se insertaron los diferentes fragmentos de DNA, por delante de un promotor mínimo y del gen *luc2*.

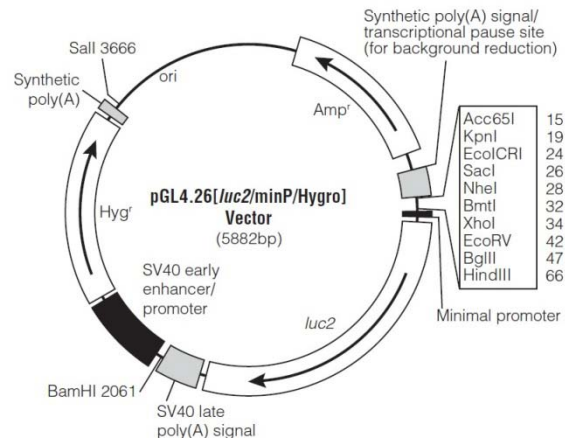


Figura 10. Representación esquemática del plásmido comercial pGL4.26, utilizado como aceptor de los fragmentos reguladores de *TBX15* testados por ensayos de luciferasa.

En los casos de estudio del papel regulador del factor NFκB P65 en la región reguladora de *TBX15* seleccionada, se cotransfectaron los plásmidos reporteros de luciferasa con el vector de expresión P65 (pcDNA3-p65), que codifica para la totalidad del gen *P65*. Fue utilizado a una concentración de 0.8μg DNA/pozo. Obtenido del laboratorio del Dr. Leonardi, Nápoles, Italia.

La línea celular HEK.293 se utilizó para la transfección en todos los ensayos de luciferasa. Las células HEK.293 se plaquearon (10^5 células/poro) con 2mL de su propio medio, y fueron transfectadas utilizando el reactivo Lipofectamine® 2000 (Life Technologies) siguiendo el protocolo estándar del fabricante. Los constructos con el gen reportero de luciferasa (0.5μg/poro) se cotransfectaron junto con el plásmido que expresa la proteína renila (Promega) (0.25μg/poro), tomado como control de transfección. En los casos en los que se utilizaba el plásmido P65, la cotransfección se realizó con 0.15μg/poro de los constructos reporteros con luciferasa, 0.05μg/poro de los plásmidos

reporteros con renilla y 0.8µg del plásmido P65 (o un vector vacío pcDNA3.1 como control negativo).

3.2.2. Transfección de siRNA

Las células FRO y TPC-1 se sembraron en placas de 6 pocillos (2×10^5 células/pozo) con 2mL de su propio medio, y fueron transfectadas doblemente (24 y 48h después de su siembra) utilizando Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen), tal y como se detalla en el protocolo de la casa comercial, llegándose a una concentración final de 20nM siRNA/pozo.

Se utilizaron dos siRNA diferentes de manera independiente para silenciar la expresión de *TBX15*, y un siRNA como control negativo de esta inhibición. Los tres siRNA utilizados fueron obtenidos en la casa comercial Ambion, Life Technologies™:

TBX15: Silencer® Select s13838 (TBX15-siRNAa)
Silencer® Select s13840 (TBX15-siRNAb)
Silencer® Negative Control # 4 siRNA (control siRNA)

3.3. Ensayos celulares

3.3.1. Contaje celular

Células FRO se sembraron en placas de 6 pozos (2×10^5 células/pozo) y se transfectaron con los plásmidos TBX15.V o EV. Después de 24h de la transfección, las células se trataron con CPT 10mM. A las 0, 24, 48 y 72h de tratamiento, las células fueron lavadas, tripsinizadas y recolectadas para su posterior contaje, utilizando un contador celular (Beckman Coulter Z2, GMI). Cada uno de los tres experimentos se realizó por triplicado.

3.3.2. Ensayo de apoptosis

La apoptosis se evaluó mediante una doble tinción con anexina-V-fluoresceína (FITC) y yoduro de propidio (PI). Células FRO y TPC-1 (2×10^5 células/pozo) fueron transfectadas con los plásmidos TBX15.V o EV y fueron

tratadas (o no) con CPT 10mM. Después de 48h de tratamiento, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en 100µL de un tampón que incorporaba la anexina-V-FITC y el PI (Annexin-V-FLUOS Staining Kit, Roche). Después de 15min de incubación en oscuridad, las células se analizaron con el citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences). El ensayo se realizó por triplicado al menos en 3 ocasiones. Los resultados se analizaron y se presentan como porcentajes del total de células apoptóticas, utilizando el programa FlowJo (Tree Star, Ashland, OR).

3.3.3. Ensayo de formación de colonias en *soft agar*

Células FRO y TPC-1 se sembraron en placas de 6 pocillos (2x10⁵ células/pozo) y fueron transfectadas con el plásmido de expresión de TBX15 (TBX15.V) o con el vector vacío como control (EV). Después de 24h de transfección, las células FRO y TPC-1 fueron resuspendidas en DMEM con 0.6% de agarosa (Pronadisa) y sembradas en una capa de medio 0.7% de agarosa. Se hizo un seguimiento de las colonias y se contaron después de 14-21 días de incubación.

3.3.4. Ensayo de luciferasa

Células HEK.293 se sembraron en placas de 6 pocillos (10⁵ células/pozo) con 2mL de su propio medio y fueron transfectadas utilizando el reactivo Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Life Technologies). Brevemente, la cotransfección fue realizada con los diferentes constructos reporteros de luciferasa (0.5µg/pozo) y el plásmido de expresión de *renilla* (Promega) como control de transfección (0.25µg/pozo). En los casos en los que se requería el plásmido P65, la cotransfección se realizaba en las siguientes proporciones: 0.15µg/pozo de los constructos de luciferasa, 0.05µg/pozo del control de transfección *renilla* (Promega) y 0.8µg del plásmido P65 (o el vector vacío pcDNA3.1 como control negativo). Las células se recolectaron a las 24h después de la transfección, o a las 24h de la estimulación con TNFα, y se lisaron con el tampón PLB. La actividad de la luciferasa se analizó utilizando el kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega). Las transfecciones se realizaron por duplicado y todos los experimentos se repitieron, como mínimo, tres veces.

3.3.5. Ensayo de migración celular

La capacidad de migración de las células se llevó a cabo mediante el ensayo de “herida” (*wound healing assay*). Brevemente, después de transfectar las células FRO y TPC-1 con el plásmido TBX15.V (o EV), se dejaron crecer hasta el 90% de confluencia y se practicaron 3 surcos en la monocapa de células utilizando una punta de pipeta P-200. A las 0, 48 y 72h de incubación, y mediante un microscopio de contraste de fase, se visualizaron y midieron las áreas de separación.

3.3.6. Ensayo de viabilidad celular

El ensayo XTT, basado en la capacidad celular de reducir sales de tetrazol, fue utilizado para analizar la actividad mitocondrial en células viables. Células FRO fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de 2×10^5 células por pozo y se incubaron toda la noche para ser transfectadas con los vectores TBX15.V o EV a la mañana siguiente. Después de 24h de la transfección, las células se trataron o no con CPT 10mM. A las 0, 24, 48 y 72h de tratamiento, 800 μ L de la solución XTT (Cell Proliferation Kit II, Roche) se añadió a cada pocillo y después de 2h de incubación, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Sunrise Microplate Reader, Tecan) a 492nm con una longitud de onda de 690nm como referencia. Se realizaron 3 experimentos independientes, con triplicados en cada uno de ellos.

4. Análisis bioinformático

Aproximadamente 1kb de la región 5' del gen *TBX15*, obtenida de la base de datos genómica humana Ensembl GRCh38.p2 (cromosoma1: 118992365-118993457) (www.ensembl.org), fue analizada para detectar posibles secuencias de unión de factores de transcripción.

La predicción de los potenciales sitios de unión de los factores de transcripción se realizó comparando varias bases de datos con un valor de corte > 85%: MatInspector (www.genomatix.de), rVista 2.0 (<http://rvista.dcode.org>), TFBS

(<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>) y la base de datos CONSITE (<http://consite.genereg.net/>).

5. Análisis estadístico

Todos los resultados numéricos han sido calculados y expresados como la media \pm desviación estándar (SD). Las diferencias entre grupos se han comparado mediante el test estadístico t-Student, tomando un p-valor (P) menor de 0.05 como estadísticamente significativo.



RESULTADOS

RESULTADOS

1. Artículo I: Función de TBX15.

Arribas J, Giménez E, Marcos R, Velázquez A. Novel antiapoptotic effect of TBX15: overexpression of *TBX15* reduces apoptosis in cancer cells. *Apoptosis* 2015; 20: 1338-1346.

1.1. Resumen

TBX15 es un factor de transcripción de la familia T-box, cuyos miembros son importantes en la regulación de muchos procesos del desarrollo, además de tener un papel importante en la proliferación y la supervivencia celular. La función de TBX15 se relaciona con procesos en el desarrollo, así, la alteración de *TBX15* en humanos causa el síndrome de Cousin, caracterizado por anomalías en el esqueleto. TBX15 también está implicado en la diferenciación de adipocitos y, recientemente, la metilación de *TBX15* se ha propuesto como marcador en cáncer de próstata. Estudios preliminares en nuestro laboratorio indican la expresión alterada de TBX15 en líneas celulares de cáncer de tiroides.

En este trabajo estudiamos la función celular de TBX15 relacionada con el desarrollo del cáncer. Primeramente, confirmamos que TBX15 muestra sobreexpresión en líneas celulares de cáncer de tiroides, analizando por *western blot* nueve líneas celulares de este tipo de cáncer y comparándolas con la línea normal. Para determinar el posible papel de TBX15 en carcinogénesis se realizaron estudios funcionales a nivel celular en dos líneas celulares transfectadas con un plásmido de expresión de *TBX15* (simulando condiciones de sobreexpresión de *TBX15*). Los ensayos celulares realizados comprendieron: análisis de proliferación, de viabilidad celular, de formación de colonias, de migración celular y de apoptosis. Como control positivo en los ensayos de viabilidad, proliferación y apoptosis se utilizó el agente citotóxico camptotecina. Los resultados indicaron que la transfección de *TBX15* no afectaba a la viabilidad celular, sin embargo, sí que se observaba un incremento en la proliferación celular. De acuerdo con estos resultados, la apoptosis disminuye significativamente en las células transfectadas con *TBX15*, tanto en presencia o no del agente citotóxico. El papel antiapoptótico de TBX15 fue comprobado mediante silenciamiento con RNA de interferencia del gen *TBX15* endógeno, con el consiguiente aumento de la apoptosis celular.

Seguidamente, el análisis de la expresión de proteínas implicadas en las principales vías de la apoptosis mostró que TBX15 interviene en la vía intrínseca mitocondrial de apoptosis. De manera que, después de la transfección celular con *TBX15*, se observó la disminución de la proteína proapoptótica Bax y el incremento de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL, además de la disminución de dos factores

adicionales indicadores de la vía intrínseca mitocondrial: la liberación del citocromo c y la activación de la caspasa 9.

Como conclusión, estos resultados demuestran por primera vez que *TBX15* tiene un papel antiapoptótico a nivel celular, lo cual puede contribuir al aumento de la proliferación de las células cancerosas. Esto, junto con la sobreexpresión de *TBX15* que muestran las líneas celulares de cáncer de tiroides, sugiere un papel de *TBX15* en la carcinogénesis, mostrándose como una posible diana terapéutica.



Novel antiapoptotic effect of *TBX15*: overexpression of *TBX15* reduces apoptosis in cancer cells

Jéssica Arribas¹ · Esteban Giménez¹ · Ricard Marcos^{1,2} · Antonia Velázquez^{1,2}

Published online: 28 July 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract T-box genes regulate development processes, some of these genes having also a role in cell proliferation and survival. *TBX15* is a T-box transcription factor that, recently, has been proposed as a marker in prostate cancer, but its function in carcinogenesis is unknown. Here the role of *TBX15* in carcinogenesis was investigated using thyroid cancer cell lines. First, using western blot analysis, we show that the expression of *TBX15* was altered in thyroid cancer cells lines with respect to normal thyroid cells. Transfection of thyroid cancer cells with *TBX15*, in the presence or absence of camptothecin as a cytotoxic agent, proved non effect of *TBX15* in cell viability; but, it increased cell proliferation after 48 h of transfection ($P < 0.01$). Consistently, apoptosis was reduced in *TBX15* transfected cells ($P < 0.01$) which also showed a decrease of the proapoptotic Bax regulator and an increase of the antiapoptotic Bcl2 and Bcl-XL regulators. Additionally, siRNA shutdown of constitutive *TBX15* increased apoptosis. *TBX15* transfection did not alter colony formation and cell migration. Taken together, these results indicate for the first time an antiapoptotic role of *TBX15* in cancer cells, suggesting a contribution of *TBX15* in carcinogenesis and the potential therapeutic target of *TBX15*.

[enlace revista](#)

(disponible en la versión impresa)

✉ Jéssica Arribas
jessica.arribas@uab.es

✉ Antonia Velázquez
antonia.velazquez@uab.es

¹ Grup de Mutagènesi, Unitat de Genètica, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, 08193 Barcelona, Spain

² CIBER Epidemiología y Salud Pública, ISCIII, Madrid, Spain

2. Artículo II: Regulación de la expresión de *TBX15*

Arribas J, Cajuso T, Marcos R, Leonardi A, Velázquez A. **NF-kB mediated transcriptional regulation of *TBX15***. (En vías de publicación)

2.1. Resumen

El papel antiapoptótico de *TBX15*, ilustrado en el apartado 1 de Resultados, sugiere un papel de *TBX15* en la carcinogénesis, lo cual requiere resolver otras muchas cuestiones para poder entender su contribución en el desarrollo tumoral. Un aspecto clave es entender el patrón de expresión de *TBX15* y, por lo tanto, su regulación. En este trabajo estudiamos la regulación de *TBX15* en líneas celulares de cáncer.

La regulación de *TBX15* no se conoce. Solamente existe un estudio en la bibliografía, llevado a cabo en placentas humanas, donde se identificó en el promotor distal de *TBX15* una región conservada que contiene una isla CpG relacionada con la expresión de *TBX15*. Nuestro análisis de metilación de dicha isla CpG mostró un nivel alto de metilación en las siete líneas celulares de cáncer estudiadas pero no observamos relación entre el grado de metilación y la expresión del mRNA de *TBX15* en dichas células. A pesar de ello, la desmetilación global de las células (mediante tratamiento con 5-aza-dC) incrementó el nivel de *TBX15* mRNA. Todos estos resultados indican que tanto factores epigenéticos como genéticos controlan la expresión de *TBX15*. Posteriores análisis *in silico* de secuencias reguladoras en la región 5' distal de *TBX15*, mostró tres secuencias posibles reconocidas por NFκB; además, la activación de la vía de señalización de NFκB, por estimulación con TNFα, incrementó de forma significativa la expresión de *TBX15* en cuatro líneas celulares de cáncer. Por lo tanto, nuestra hipótesis es que esta región tiene una función reguladora de *TBX15*.

Seguidamente, ensayos con luciferasa mostraron la función reguladora de la región distal de *TBX15* con respuesta positiva a TNFα y el factor p65-NFκB. Mutagénesis dirigida de dicha región reguladora permitió identificar dos sitios funcionales de unión de NFκB, en -3302 y -3059 del gen *TBX15* (kBS2 y kBS3, respectivamente), en los que la unión de la subunidad p65-NFκB era importante. Por ensayos de ChIP se confirmó la interacción directa de p65-NFκB con el sitio de unión kBS2.

En resumen, estos resultados muestran por primera vez que la vía de señalización de NFκB regula de forma positiva la expresión de *TBX15* en células de cáncer, identificando dos sitios funcionales de unión de NFκB en la región 5' distal de

RESULTADOS

TBX15. Conocida la activación de NFκB en muchos tipos de cáncer, la relación entre *NFκB* y *TBX15* mostrada en este estudio puede ser relevante para entender el papel de *TBX15* en carcinogénesis.

NF- κ B-mediated transcriptional regulation of *TBX15*

Jéssica Arribas¹, Tatiana Cajuso, Ricard Marcos^{1,2}, Antonio Leonardi³ and Antonia Velázquez^{1,2}

¹Grup de Mutagènesi, Unitat de Genètica, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallés, Barcelona, Spain

²CIBER Epidemiologia y Salud Pública, ISCIII, Spain

³Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare, Università Federico II, 80131 Napoli, Italy

Short title: Regulation of *TBX15* by NF- κ B

Corresponding authors:

Jéssica Arribas

Address: Unitat de Genètica, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallés, Barcelona, Spain

Phone: +34935814704; Fax: +34935812387

e-mail: jessica.arribas@uab.es

Antonia Velázquez

Address: Unitat de Genètica, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallés, Barcelona, Spain

Phone: +34935813111; Fax: +34935812387

e-mail: antonia.velazquez@uab.es

Abstract

TBX15 is a T-box transcription factor essential for skeleton development, being also proposed as a marker in prostate cancer; and, more recently, its antapoptotic function indicates a role in carcinogenesis. At present, the regulation of *TBX15* is uncovered. In this study, we investigated the regulation of *TBX15* expression in human cancer cells, by analysing the regulatory function of a conservative region in the distal promoter of *TBX15*. Bisulfite sequencing showed high methylation of the CpG island contained in this region that was no correlated with *TBX15* mRNA levels, in seven cancer cell lines analyzed; however, after 5-aza-dC treatment of TPC-1 cells an increased expression of *TBX15* was observed. We also found a significant response of *TBX15* to TNF- α activation of the NF- κ B pathway using four cancer cell lines (P<0.01). Next, by luciferase reporter assays, we identified the *TBX15* regulatory region containing two functional NF- κ B binding sites, on -3302 and -3059 of the *TBX15* gene (kBS2 and kBS3, respectively) with response to NF- κ Bp65. Moreover, a direct interaction of NF- κ Bp65 with the kBS2 binding site was indicated by ChIP assays. In summary, we provide novel data showing that NF- κ B signaling pathway up-regulates *TBX15* expression in cancer cells. Furthermore, the link between *TBX15* and NF- κ B found in the present study may be important to understand cancer and development processes.

Keywords: NF- κ B, *TBX15*, cancer, *TBX15* regulation

[en vías de publicación](#)

(disponible en la versión impresa)

3. Artículo III: Expresión de YY1 en cáncer de tiroides.

Arribas J, Castellví J, Marcos R, Zafón C, Velázquez A. Expression of YY1 in differentiated thyroid cancer. *Endocrine Pathology* 2015; 26:111-118.

3.1. Resumen

El factor de transcripción YY1 juega un papel esencial en la diferenciación y proliferación celular regulando gran cantidad de genes, muchos de ellos relacionados con el cáncer. Así, YY1 está implicado en el desarrollo del cáncer con una función dual de activación de oncogenes y represión de genes represores de tumores. La información acerca de la expresión alterada de *YY1* en diferentes tipos de tumores es muy extensa y su función depende del incremento o disminución de su expresión en cada tipo de tumor. Así mismo, la asociación de la expresión de *YY1* con el pronóstico de la enfermedad también varía entre los diferentes tipos de cáncer, de forma que, dependiendo del tipo de cáncer, niveles altos de expresión de YY1 muestran correlación positiva con un buen pronóstico (cáncer de próstata, mama, colon y ovario) o con la progresión tumoral (hepatoblastoma y algunos linfomas). En cáncer de tiroides no existe información de la posible implicación de YY1 en este tipo de cáncer.

En este estudio analizamos la expresión de *YY1* en cáncer de tiroides y su asociación con características clínicas de los pacientes. La expresión de *YY1* se evaluó a nivel de mRNA (mediante qPCR) y de proteína (por *western blot* o inmunohistoquímica), en líneas celulares, muestras pareadas de tejido de tiroides normal y tumoral, y en *microarrays* de tejidos pertenecientes a pacientes con cáncer de tiroides.

Nuestros resultados mostraron una sobreexpresión de *YY1* en las líneas celulares de cáncer de tiroides comparado con las líneas celulares normales, tanto a nivel transcripcional como a nivel de proteína. En las muestras de tejido de tiroides normal y tumoral también se observó un aumento significativo de la expresión de *YY1* a nivel de mRNA en los tejidos tumorales comparado con los normales, siendo el incremento evidente en el tipo papilar que mostró un aumento de nivel de YY1 en el 50% de las muestras (cuatro de ocho casos del tipo papilar; $p < 0,01$). En el análisis de *microarrays* de tejidos de pacientes con cáncer diferenciado de tiroides por inmunohistoquímica se observó expresión de la proteína YY1 a nivel nuclear, tanto en el tipo papilar como en el tipo folicular de cáncer de tiroides (48 y 19%, respectivamente).

Seguidamente, la estratificación de las muestras de acuerdo con los niveles de expresión positivos o negativos de la proteína YY1, indicó que la mayoría de las muestras con expresión positiva de YY1 correspondía a pacientes de cáncer de tiroides del tipo papilar, siendo el 88% de los pacientes con expresión positiva de YY1 pacientes de ese tipo de cáncer. Finalmente, el análisis de asociación de las características clínicas de los pacientes con la expresión de YY1 mostró una relación con la edad de diagnóstico de los pacientes.

En resumen, nuestros datos indican por primera vez que el factor de transcripción YY1 se encuentra sobreexpresado en cáncer diferenciado de tiroides, siendo el cáncer de tiroides papilar el que muestra mayor frecuencia de sobreexpresión de YY1.

Expression of YY1 in Differentiated Thyroid Cancer

Jéssica Arribas · Josep Castellví · Ricard Marcos ·
Carles Zafón · Antonia Velázquez

Published online: 20 February 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract The transcription factor Yin Yang 1 (YY1) has an important regulatory role in tumorigenesis, but its implication in thyroid cancer has not been yet investigated. In the present study, we have analyzed the expression of *YY1* in differentiated thyroid cancer and assessed the association of YY1 expression with clinical features. Expression of *YY1* was evaluated in human thyroid cancer cell lines, a series of matched normal/tumor thyroid tissues and in a thyroid cancer tissue microarray, using real-time PCR, Western blot, and/or immunohistochemistry. *YY1* was overexpressed in thyroid cancer cells, at transcription and protein levels. A significant increase of YY1 mRNA was also observed in tumor thyroid tissues. Moreover, immunohistochemical analysis of the thyroid cancer tissue microarray revealed that both papillary thyroid cancer (PTC) and follicular thyroid cancer (FTC) present increased YY1

protein levels (48 and 19 %, respectively). After stratification by the level of YY1 protein, positive YY1 expression identifies 88 % of patients with PTC. The association of YY1 expression with clinicopathological features in PTC and FTC showed that YY1 expression was related with age at diagnosis. Our data indicates for the first time overexpression of YY1 in differentiated thyroid cancer, with YY1 being more frequently overexpressed in the PTC subtype.

Keywords YY1 · Thyroid cancer · Differentiated thyroid cancer · YY1 expression · Transcription factor Yin Yang 1

J. Arribas · R. Marcos · A. Velázquez (✉)
Grup de Mutagènesi, Unitat de Genètica, Departament de Genètica i de Microbiologia, Facultat de Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain
e-mail: antonia.velazquez@uab.cat

J. Castellví
Department of Pathology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

R. Marcos · A. Velázquez
CIBER Epidemiologia y Salud Pública, ISCIII, Madrid, Spain

C. Zafón (✉)
Diabetes and Metabolism Research Unit (VHIR) and Department of Endocrinology, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain
e-mail: 26276czl@comb.cat

C. Zafón
CIBER Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, ISCIII, Madrid, Spain

[enlace artículo](#)

(disponible en la versión
impresa)



DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se parte de la premisa de que la región 1p12 del cromosoma 1 en humanos está asociada con el cáncer de tiroides (Baida *et al*, 2008). Uno de los polimorfismos de asociación es el SNP rs2145418, que se encuentra en una región muy conservada pero vacía de genes. Análisis *in silico* de esta región predijeron una secuencia de unión para el factor de transcripción YY1, y el gen más cercano al SNP rs2145418 se encuentra a 460kb y codifica para otro factor de transcripción, el TBX15. Así, estos estudios de nuestro laboratorio permitieron plantear los estudios que se presentan en esta tesis. Además, el hecho de que la región 1p12 del cromosoma 1 humano se encuentra alterada en muchos y distintos tipos de cáncer, como leucemias linfocíticas, mielomonocíticas y limfoblásticas, adenocarcinomas de mama, intestino, riñón y ovario, neuroblastomas, mielomas de diferentes tipos,... (Mitelman Database, 2015), añade relevancia a nuestros estudios.

Hay que destacar que TBX15 e YY1 son dos factores de transcripción y los factores de transcripción, como moléculas transductoras de señales, ejercen un papel clave en la regulación de muchos procesos básicos del funcionamiento y fisiología de la célula, como pueden ser la proliferación celular, la inducción de la apoptosis o la reparación del DNA. Así, la activación oncogénica de ciertos factores de transcripción permite que actúen de manera constitutiva sin necesidad de señales externas, de la misma forma, la inactivación de otro tipo de factores de transcripción que ejercen como supresores de tumores genera también alteración en sus actividades. Como resultado, se inician una serie de procesos descontrolados que son característicos del cáncer, como: la síntesis continuada de proteínas implicadas en la promoción del ciclo

celular, la evasión de la apoptosis, la angiogénesis, la capacidad de invadir los tejidos o de generar metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011). Por lo tanto, la expresión y función aberrantes de los factores de transcripción son un punto importante en la aparición y desarrollo del cáncer. En cáncer de tiroides se ha descrito la asociación de ciertos factores de transcripción específicos del tiroides con este tipo de cáncer (Fernández *et al.*, 2015), pero no existe información acerca de la implicación de otros factores de transcripción generales, ni tampoco sobre TBX15 e YY1. Si nos referimos al cáncer en general, la implicación de YY1 está bien documentada (Castellano *et al.*, 2009); sin embargo, no existen estudios relativos a la posible implicación de TBX15 en cáncer.

En este contexto, la presente tesis aporta conocimiento sobre el papel del factor de transcripción TBX15 en el desarrollo del cáncer, y se analiza la expresión de YY1 en cáncer de tiroides.

1. TBX15 y cáncer.

TBX15 es un factor de transcripción cuya función se ha relacionado con procesos importantes en el desarrollo, sobre todo del esqueleto (Singh *et al.*, 2005). Esto y el hecho de que pertenezca a la familia de factores T-box, con muchos miembros con efectos en la proliferación celular, la invasión y la metástasis (Wansleben *et al.*, 2014), permite plantear la hipótesis de que TBX15 también está implicado en el cáncer. Además, como se ha indicado anteriormente, en nuestro laboratorio se definió la asociación de la región cromosómica 1p12, donde se sitúa TBX15, con el cáncer de tiroides (Baida *et al.*, 2008).

Todo ello nos condujo a estudiar la función de TBX15 en la biología de la célula y su relación con el desarrollo del cáncer. Primeramente, confirmamos la sobreexpresión de TBX15 en líneas celulares de cáncer de tiroides, y después se realizaron una serie de estudios funcionales. Estos estudios indicaron el papel antiapoptótico de TBX15, lo cual puede contribuir al desarrollo del cáncer permitiendo el aumento de la proliferación.

A partir de estos resultados y dado que nuestro análisis indicó que la expresión de TBX15 está alterada en líneas celulares de cáncer de tiroides, seguidamente nos

propusimos estudiar la regulación de la expresión de *TBX15*. Así, en este trabajo se demuestra que la activación de la vía de señalización de NFκB regula positivamente a *TBX15*, y se identificaron dos sitios funcionales de unión de NFκB en la región 5'-distal de *TBX15*.

1.1. Función de *TBX15* relacionada con el cáncer.

La función de *TBX15* a nivel celular se analizó en condiciones de expresión ectópica de *TBX15* mediante la transfección con un plásmido de expresión para *TBX15*. Observamos cómo esta sobreexpresión aumentaba la proliferación celular y disminuía la apoptosis en las células transfectadas. Estos resultados se confirmaron posteriormente mediante la utilización de RNA de interferencia para *TBX15*, que mostró un efecto inverso a la sobreexpresión de *TBX15*, es decir, la inhibición de *TBX15* mostró un incremento de la apoptosis comparado con la actividad constitutiva de *TBX15* en la célula.

Estos resultados son novedosos al definir el papel antiapoptótico de *TBX15*, aportando información a las evidencias que existen de que ciertos genes T-box están implicados en el desarrollo tumoral. Entre ellos encontramos algunos con carácter oncogénico, mostrándose sobreexpresados en cáncer, y otros que actúan como supresores de tumores, encontrándose en bajos niveles en diferentes tipos de cáncer (Wansleben *et al.*, 2014).

Entre los miembros de la familia T-box que presentan niveles bajos de expresión en cáncer y una función supresora de tumores reconocida se encuentra *TBX1*, capaz de restablecer la inhibición por contacto del crecimiento celular, además de suprimir la transformación y proliferación celular en células tumorales de piel (Trempus *et al.*, 2012). De manera similar, *TBX5* suprime el crecimiento de células cancerosas y promueve la apoptosis (He *et al.*, 2002), en cáncer de colon *TBX5* se inactiva debido a la metilación de su promotor (Yu *et al.*, 2010). La expresión baja de *TBX4* en adenocarcinomas del conducto pancreático se relaciona con un mal pronóstico del paciente, y se considera que este factor también actúa como supresor de tumores (Zong *et al.*, 2011).

Otros miembros de la familia T-box como *TBX2* y *TBX3*, se encuentran sobreexpresados en varios cánceres humanos: mama, páncreas, ovario y cérvix

(Vance *et al.*, 2005; Rodriguez *et al.*, 2008), y promueven la tumorigénesis al inhibir la senescencia celular, facilitando la transformación, el crecimiento y la migración celular (Rowley *et al.*, 2004). El gen *brachyury* se sobreexpresa en cáncer de esófago, vesícula y ovario (Palena *et al.*, 2007); con evidencias de participar en la transición epitelio-mesénquima, paso importante en la evolución de los tumores secundarios (Fernando *et al.*, 2010). Otro miembro de la familia T-box que también se encuentra sobreexpresado en cáncer es *TBX21*, pero muestra un carácter diferente a los anteriormente citados. *TBX21* está relacionado con cánceres de tipo hormonal y confiere resistencia a las células cancerosas al tratamiento con tamoxifen (McCune *et al.*, 2010).

En nuestro estudio observamos niveles altos de TBX15 en líneas celulares de cáncer de tiroides con respecto a las células normales de tiroides que, junto con la reducción de la apoptosis producida por TBX15, tendría un efecto proliferativo favoreciendo la tumorigénesis. Como hemos indicado anteriormente, TBX2, TBX3 y Brachyury también promueven el crecimiento celular. Asimismo, la función antiapoptótica de TBX15 concuerda con el papel que juega TBX15 durante el desarrollo. TBX15 es un factor de transcripción necesario durante el desarrollo del esqueleto, mostrando expresión dinámica en el desarrollo de las extremidades y durante la formación endocondrial temprana del hueso. Así, el número de células precursoras mesenquimáticas y condrocitos tiene una relación directa con la expresión de *TBX15*, por lo que la tasa de proliferación de estas células en ratones *Tbx15^{-/-}* está disminuida afectando al desarrollo del esqueleto en los embriones mutantes (Singh *et al.*, 2005).

Los genes diana del factor de transcripción TBX15 aún son desconocidos pero, dada la función antiapoptótica de TBX15 demostrada en este trabajo, cabría esperar que TBX15 regulase alguna de las proteínas relacionadas con las diferentes vías de la apoptosis celular. Así, las células con sobreexpresión de TBX15 y que mostraban una disminución de la apoptosis, también presentaban alteración en la expresión de proteínas marcadoras de apoptosis. En concreto, observamos disminución de la proteína pro-apoptótica Bax y un aumento de las proteínas anti-apoptóticas Bcl2 y Bcl-XL. Por lo tanto, en las células con sobreexpresión de TBX15, la supresión de la apoptosis por TBX15 se produce por alteración de la relación entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas características de la vía de apoptosis intrínseca mitocondrial (Wong, 2011), provocando reducción de la vía, que queda reflejado por la

disminución de la liberación de citocromo c y reducción de la activación de las caspasas 9 y 3.

1.2. Regulación de la expresión de *TBX15*.

Una vez establecida la función antiapoptótica de *TBX15*, el incremento de la proteína *TBX15* en líneas celulares de cáncer de tiroides sugiere que, durante el desarrollo tumoral, la alteración de la expresión de *TBX15* podría contribuir a la proliferación celular. Por lo tanto, es importante estudiar la regulación de *TBX15* para entender su papel en cáncer. Hasta el momento, los mecanismos que controlan la expresión de *TBX15* son desconocidos. Solamente existe un trabajo en la bibliografía que sugiere la regulación compleja de *TBX15*. En dicho trabajo Chelbi y colaboradores (2011) observaron que en patologías de placenta con fallo en el crecimiento del feto, los niveles de mRNA de *TBX15* eran menores que en las placentas normales. Asimismo, identificaron una zona situada en la región 5'-distal de *TBX15* diferencialmente metilada en placentas patológicas. Además, el grado de metilación de esta región modula la interacción del factor de transcripción PDX1 controlando la expresión de *TBX15*. Estos resultados sugieren una cooperación de factores genéticos y epigenéticos en la regulación de *TBX15* cuya contribución relativa establece la función de *TBX15* en cada tipo celular y durante el desarrollo.

La región reguladora de *TBX15* descrita por Chelbi y colaboradores (2011) está altamente conservada y presenta una isla CpG, por lo que centramos nuestros estudios en analizar el papel de esta región en la regulación de *TBX15* en células de cáncer. El análisis de la metilación de esta isla CpG en líneas celulares de cáncer muestra una falta de relación entre el estado de metilación de la isla CpG y los niveles de *TBX15* mRNA en dichas líneas celulares. Sin embargo, sí que la desmetilación global de la célula provoca un incremento en la expresión de *TBX15* mRNA, lo que indica que el estado de metilación de otras regiones del gen *TBX15* son importantes para modular su expresión. De hecho, el estado de metilación del promotor de *TBX15* se ha relacionado con características clinicopatológicas en cáncer de próstata, aunque el estudio no indica cómo afecta la metilación en la expresión de *TBX15* (Kron *et al.*, 2012).

Además de la isla CpG indicada, la región conservada del extremo 5' del gen *TBX15* posee tres sitios de unión de NFκB. Por otro lado, la estimulación con TNFα (activador de la vía de señalización de NFκB) de HeLa y tres líneas celulares de cáncer de tiroides, produce un incremento de la expresión de *TBX15*. Sin embargo, el estímulo con TNFα es incapaz de aumentar la expresión de *TBX15* en las células MEF p65^{-/-} comparado con la expresión de *TBX15* en las células MEF p65^{+/+}. Todo ello indica que NFκB regula la expresión de *TBX15* y que la subunidad p65-NFκB es importante en esta regulación.

Ensayos de luciferasa nos permitieron limitar la región reguladora a un fragmento de unas 600bp en la región 5'-distal de *TBX15* y que contiene los tres sitios de unión para NFκB predichos por las bases de datos. Este fragmento responde positivamente a la activación con TNFα y a niveles altos de p65-NFκB. Ensayos de luciferasa con plásmidos reporteros que contenían las secuencias diana de NFκB mutadas indicaron que dos de los sitios predichos son funcionales estando localizados en las posiciones -3302 y -3059 del gen *TBX15*. La técnica de CHIP permitió establecer la unión directa de p65-NFκB en el sitio -3302, y posiblemente se necesita la acción cooperativa de los dos sitios de unión de NFκB para integrar las señales de NFκB que se requieren en la regulación positiva de *TBX15* mediada por NFκB. Además, es posible que la regulación de *TBX15* requiere de otros factores que pueden actuar de forma específica en distintos tipos celulares. Así, en patologías de placentas, *TBX15* es regulado negativamente por PDX1 dependiendo del estado de metilación de *TBX15* (Chelbi et al., 2011).

Es interesante destacar la relación entre *TBX15* y NFκB encontrada en nuestro trabajo ya que puede ayudar a entender el papel de *TBX15* durante el desarrollo y en los procesos cancerígenos. El papel central de NFκB en muchos procesos celulares importantes, como en el ciclo celular, la proliferación o la diferenciación, a través de la regulación de sus genes diana, está muy documentado (Joyce *et al.*, 2001; Hayden y Ghosh, 2008). Además, se ha descrito la activación constitutiva de NFκB en muchos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de tiroides (Escárcega *et al.*, 2007; Pacifico y Leonardi, 2006), y actúa como un oncogén activando la proliferación celular e inhibiendo la apoptosis (Karin y Lin, 2002; Pacifico *et al.*, 2004). La actividad antiapoptótica de *TBX15* junto con la regulación por NFκB de *TBX15*, sugiere que NFκB puede promover la inhibición de la apoptosis atribuida a *TBX15*, situando a *TBX15* como un gen diana de la actividad antiapoptótica de NFκB. Así, a pesar de que

la expresión de *TBX15* en cáncer es desconocida, la modulación de la expresión de *TBX15* por NFκB hace pensar que la expresión estaría alterada en diferentes tipos de cáncer. De hecho, nosotros indicamos en este trabajo que la expresión de *TBX15* está alterada en células de cáncer de tiroides; y la activación de NFκB en cáncer de tiroides está bien establecida (Pacífico y Leonardi, 2010; Xing, 2013); por lo que, en otros tipos de cáncer, cabe esperar una relación entre la activación de NFκB y la expresión de *TBX15*.

Durante el desarrollo también existen indicios que apoyan que *TBX15* puede ser un gen diana de NFκB. Así, en el embrión, durante la formación de las extremidades, NFκB actúa como transmisor de señales de crecimiento entre el ectodermo y el mesénquima (Bushdid *et al.*, 1998), lugar donde *TBX15* regula el número de células precursoras mediante el control de su proliferación (Singh *et al.*, 2005).

En resumen, nuestro estudio describe una nueva función del factor de transcripción *TBX15* como inhibidor de la apoptosis celular, lo que puede contribuir al potencial proliferativo de las células cancerígenas y sugiere a *TBX15* como una diana terapéutica potencial en el tratamiento del cáncer. También, hemos demostrado que NFκB regula positivamente la transcripción de *TBX15* mediante su unión a una región reguladora en la zona 5'-distal del gen *TBX15*. La relación entre *TBX15* y NFκB puede ser importante para entender el papel de *TBX15* en el cáncer.

2. Expresión de YY1 en cáncer de tiroides

YY1 es un factor de transcripción que se expresa de manera ubicua, pero su expresión se encuentra alterada en muchos tipos de cánceres humanos (Zaravinos *et al.*, 2010). YY1 tiene un papel esencial en la diferenciación y proliferación celular regulando gran cantidad de genes, muchos de ellos relacionados con el cáncer (Castellano *et al.*, 2009). Su papel en la tumorigénesis es complejo, presenta actividad oncogénica pero tiene una función dual, por lo que produce activación de oncogenes y represión de genes supresores de tumores (Zhang *et al.*, 2011). Su función dependería de si presenta un incremento o una disminución de su expresión en cada tipo de tumor; de hecho, la extensa información acerca de la alteración de la expresión de YY1 muestra que es dependiente del tipo de cáncer (Zaravinos *et al.*, 2010; Zhang

et al., 2011). Así mismo, la asociación de la expresión de YY1 con el pronóstico del cáncer también difiere entre los diversos tipos de tumor. En cáncer de ovario, próstata, mama y colon su expresión se relaciona con un buen pronóstico para el paciente (Berchuck *et al.*, 2005; Matsumura *et al.*, 2009); en cambio, niveles altos de expresión de YY1 en hepatoblastoma y algunos linfomas se correlacionan directamente con la progresión del tumor y, por lo tanto, con un mal pronóstico de la enfermedad (de Nigris *et al.*, 2006; Libra *et al.*, 2008). En cáncer de tiroides, sin embargo, no existe información al respecto.

En este estudio describimos por primera vez que YY1 se encuentra sobreexpresado en cáncer diferenciado de tiroides, lo que sugiere su implicación en este tipo de cáncer. El análisis de la expresión de YY1 en líneas celulares de cáncer de tiroides mostraba niveles superiores de mRNA y proteína YY1 en estas células y no en células normales de tiroides, con una correlación positiva entre los niveles de transcrito y proteína. Estudios previos de expresión de YY1 en células de cáncer de mama y de linfoma también muestran incremento de mRNA y proteína YY1 (Begon *et al.*, 2005; Castellano *et al.*, 2010).

In vivo, los estudios de la expresión de YY1 se basan principalmente en análisis transcripcionales (Zaravinos *et al.*, 2010) donde los niveles de expresión de YY1 alterados, incremento o disminución, depende del tipo de cáncer. Nuestro análisis de muestras apareadas, normal/tumor, de pacientes con cáncer diferenciado de tiroides indica un incremento de YY1 mRNA en las muestras tumorales comparado con el tejido normal. Aunque el número de muestras disponible para el análisis fue limitado, estos resultados apoyan la sobreexpresión de YY1 observada previamente en líneas celulares de cáncer de tiroides y son una evidencia adicional de la implicación de YY1 en este tipo de cáncer. La sobreexpresión de YY1 también se ha descrito en otros tipos de cáncer como en mama, próstata, cerebro, colon, osteosarcomas y linfomas de células B gigantes (Castellano *et al.*, 2010; Wan *et al.*, 2012; Seligson *et al.*, 2005; Baritaki *et al.*, 2009; de Nigris *et al.*, 2006; Chinnapan *et al.*, 2009).

El análisis por inmunohistoquímica de *microarrays* de tejidos de cáncer de tiroides también indica una expresión alta de YY1 en las muestras de tejido tumoral de los pacientes con cáncer diferenciado de tiroides, lo que está de acuerdo con lo

observado en líneas celulares y en las muestras pareadas de pacientes de cáncer de tiroides analizadas.

En el análisis de *microarrays*, el número de muestras fue mayor y nos permitió clasificar los tumores de acuerdo a la expresión de YY1 positiva o negativa, observando que la mayoría de tumores con expresión positiva para YY1 corresponden a pacientes con cáncer de tiroides del tipo papilar. En concreto, la expresión positiva de YY1 identifica al 88% de los pacientes de cáncer papilar de tiroides. Estos resultados sugieren que en cáncer diferenciado de tiroides, YY1 podría intervenir en la regulación de vías específicas del desarrollo del cáncer papilar de tiroides. Así, estudios de las alteraciones genéticas en cáncer diferenciado de tiroides han permitido establecer vías del desarrollo tumoral bien diferenciadas entre los subtipos papilar y folicular. Por ejemplo, en el tipo papilar las alteraciones más frecuentes corresponden a mutaciones puntuales en los genes *BRAF* o *RAS*, o reordenamientos *RET/PTC*, que llevan a la activación constitutiva de la vía de señalización de las MAP quinasas. En cambio, en el tipo folicular, la proteína RAS alterada puede actuar tanto activando la vía de las MAP quinasas como la vía de señalización de la PI3K; además, una alteración frecuente en el subtipo folicular de cáncer de tiroides es la reordenación *PAX8-PPAR γ* que da lugar a la correspondiente proteína de fusión que inhibe a PTEN afectando a la vía PI3K (Romitti *et al.*, 2013). Estudios genómicos más recientes, también indican la existencia de diferentes subgrupos moleculares en el subtipo papilar de cáncer de tiroides, así como la importancia de moduladores de la cromatina en el desarrollo del cáncer de tiroides (Xing, 2013; Cancer Genome Atlas Research Network, 2014). Es interesante señalar que YY1 actúa en la regulación epigenética de muchos genes relacionados con el cáncer, lo que podría explicar la expresión alterada de YY1 en cáncer (Jeon y Lee, 2011; Zhang *et al.*, 2011). En nuestro caso de estudio, el cáncer diferenciado de tiroides, la expresión alterada de YY1 podría contribuir a los cambios epigenéticos que se producen en el cáncer de tiroides (Xing, 2007; Hou *et al.*, 2011; Mancikova *et al.*, 2014). Dado el desconocimiento acerca de la regulación de YY1, estos estudios son necesarios para entender la función de YY1 en el cáncer de tiroides y explorar la posible utilización de la expresión de YY1 en el diagnóstico de este tipo de cáncer.

La expresión de YY1 relacionada con las características clínicas de los pacientes depende del tipo de cáncer; mientras que la sobreexpresión de YY1 está asociada con mal pronóstico en osteosarcomas y hepatosarcomas (de Nigris *et al.*,

2006; Libra *et al.*, 2008), en cáncer de ovario, colon y mama se relaciona con tasas de supervivencia mayores (Berchuck *et al.*, 2005; Matsumura *et al.*, 2009). En cáncer de tiroides, nosotros observamos relación entre la expresión de YY1 y la edad de diagnóstico del cáncer, pero esta relación es diferente para los tipos papilar y folicular. En el tipo papilar, la asociación de YY1 con la edad es estadísticamente significativa, donde en el grupo con expresión positiva de YY1, el 70% de los pacientes de tipo papilar son menores de 45 años. En cambio, para el subtipo folicular, los pacientes que expresan YY1 tienden a ser mayores de 45 años. A pesar de que la edad de diagnóstico es un factor bien establecido para el pronóstico del cáncer de tiroides (Tran *et al.*, 2012), no es fácil explicar el significado clínico de la relación opuesta entre los subtipos papilar y folicular encontrada en este estudio. Es posible que la asociación de YY1 con la edad, que se observa en nuestro estudio, sea una consecuencia de la diferente edad de aparición del tumor que se da en los subtipos papilar y folicular de cáncer de tiroides, ya que está descrito que los pacientes con cáncer diferenciado de tiroides de tipo papilar son más jóvenes que los de tipo folicular (Lang *et al.*, 2007). Así, en nuestro estudio, la asociación de YY1 con la edad tan sólo reflejaría la diferente edad de diagnóstico entre el cáncer papilar y folicular, aunque los resultados indican que la expresión positiva de YY1 es importante en el desarrollo tumoral del cáncer diferenciado de tiroides. Además, observamos que los pacientes del subtipo papilar con expresión positiva de YY1 presentan una tendencia a poseer metástasis en los nódulos linfáticos. La afectación de los nódulos linfáticos se ha descrito como una señal de mal pronóstico (Nixon y Shaha, 2013), por lo que nuestros resultados podrían indicar una relación entre el nivel de expresión de YY1 y la evolución del cáncer de tiroides.

En cualquier caso, nuestros resultados representan el primer estudio de la implicación de YY1 en el cáncer de tiroides sin tener información previa sobre la expresión de este factor en este tipo cáncer. Mostramos como YY1 se encuentra sobreexpresado en cáncer diferenciado de tiroides, pero la validación de este estudio analizando un número mayor de muestras permitirá determinar la importancia de YY1 en cáncer de tiroides. De todas formas, la asociación significativa de la expresión positiva de YY1 con el cáncer de tiroides papilar resulta relevante debido a que la incidencia de este subtipo de cáncer tiroideo se encuentra actualmente en aumento (Morris *et al.*, 2013).

En conclusión, nuestro estudio muestra por primera vez como el factor de transcripción YY1 se encuentra sobreexpresado en cáncer diferenciado de tiroides, siendo más frecuente su expresión positiva en el tipo papilar que en el folicular, poniendo en evidencia la posible implicación de YY1 en el cáncer de tiroides.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Partiendo de los objetivos iniciales y después de discutir los resultados expuestos, de esta tesis obtenemos las siguientes conclusiones:

1. El factor de transcripción TBX15 se encuentra sobreexpresado en las nueve líneas celulares de cáncer de tiroides analizadas por *western blot*, al compararlas con las líneas celulares de tiroides normales, S11N y S63N.
2. TBX15 tiene una función antiapoptótica, lo que indica su implicación en procesos proliferativos celulares.
3. TBX15 actúa en la vía intrínseca mitocondrial de la apoptosis. Así, la sobreexpresión de *TBX15* disminuye la apoptosis al alterar la relación de proteínas proapoptóticas/antiapoptóticas que, a su vez, reduce la liberación mitocondrial de citocromo c y produce menor activación de las caspasas 9 y 3.
4. El nivel mayor de la proteína TBX15 en líneas celulares de cáncer de tiroides puede explicarse por la función antiapoptótica de TBX15.
5. El mRNA de *TBX15* aumenta tras la desmetilación global del DNA celular. Por lo tanto, la metilación del DNA es un factor regulador de la transcripción de *TBX15*.
6. La activación de la vía NFκB mediante TNFα incrementa el nivel de mRNA de *TBX15* en líneas celulares de cáncer. Por lo tanto, además de la metilación, el factor NFκB regula de forma positiva a *TBX15*.
7. La región 5' del gen *TBX15* contiene dos sitios de regulación positiva con respuesta a la activación de NFκB, situados en las posiciones -3302 y -3059 del gen *TBX15*, y denominados kBS2 y kBS3, respectivamente.

CONCLUSIONES

8. En la regulación positiva de *TBX15* por NFkB es importante la subunidad p65-NFkB que interacciona directamente con el sitio kBS2.
9. El factor de transcripción YY1 se encuentra sobreexpresado en cáncer diferenciado de tiroides, lo que sugiere su implicación en cáncer de tiroides.
10. La expresión positiva de YY1 en cáncer diferenciado de tiroides es más frecuente en el subtipo papilar que en el folicular.



REFERENCIAS

REFERENCIAS

A

Abollo-Jiménez F, Jiménez R, Cobaleda C. **Physiological cellular reprogramming and cancer.** *Seminars in Cancer Biology* 2010; 20: 98-106.

Affar EB, Gay F, Shi Y, Liu H, Huarte M, Wu S, Collins T, Li E, Shi Y. **Essential Dosage-Dependent Functions of the Transcription Factor Yin Yang 1 in Late Embryonic Development and Cell Cycle Progression.** *Molecular and Cellular Biology* 2006; 26: 3565-3581.

Agulnik SI, Papaioannou VE, Silver LM. **Cloning, mapping, and expression analysis of TBX15, a new member of the T-Box gene family.** *Genomics* 1998; 51: 68-75.

Allouche A, Nolens G, Tancredi A, Delacroix L, Mardaga J, Fridman V, Winkler R, Boniver J, Delvenne P, Begon DY. **The combined immunodetection of AP-2alpha and YY1 transcription factors is associated with ERBB2 gene overexpression in primary breast tumors.** *Breast Cancer Research* 2008; 10: R9.

Amati B, Alevizopoulos K, Vlach J. **Myc and the cell cycle.** *Frontiers in Biosciences* 1998; 3: d250-d268.

Atreya I, Schimanski CC, Becker C, Wirtz S, Dornhoff H, Schnürer E, Berger MR, Galle PR, Herr W, Neurath MF. **The T-box transcription factor eomesodermin controls CD8 T cell activity and lymph node metastasis in human colorectal cancer.** *Gut* 2007; 56: 1572-1578.

B

Bamshad M, Lin RC, Law DJ, Watkins WC, Krakowiak PA, Moore ME, Franceschini P, Lala R, Holmes LB, Gebuhr TC, Bruneau BG, Schinzel A, Seidman JG, Seidman CE, Jorde LB. **Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome.** *Nature Genetics* 1997; 16: 311-315.

Baida A, Akdi M, González-Flores E, Galofré P, Marcos R, Velázquez A. **Strong association of chromosome 1p12 loci with thyroid cancer susceptibility.** *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2008; 17: 1499-1504.

Baritaki S, Chatzinikola AM, Vakis AF, Soultziz N, Karabetsos DA, Neonakis I, Bonavida B, Spandidos DA. **YY1 Overexpression in human brain gliomas and meningiomas correlates with TGF-beta1, IGF-1 and FGF-2 mRNA levels.** *Cancer Investigation* 2009; 27: 184-192.

Baritaki S, Sifakis S, Huerta-Yepey S, Neonakis IK, Soufla G, Bonavida B, Spandidos DE. **Overexpression of VEGF and TGFβ1 mRNA in Pap smears correlates with progression of cervical intraepithelial neoplasia to cancer: implication of YY1 in cervical tumorigenesis and HPV infection.** *International Journal of Oncology* 2007; 31: 69-79.

Begon DY, Delacroix L, Vernimmen D, Jackers P, Winkler R. **Yin Yang 1 cooperates with activator protein 2 to stimulate ERBB2 gene expression in mammary cancer cells.** *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 24428-24434.

Berchuck A, Iversen ES, Lancaster JM, Pittman J, Luo J, Lee PS, Murphy SK, Dressman HK, Febbo PG, West M, Nevins JR, Marks JR. **Patterns of gene expression that characterize long-term survival in advanced stage serous ovarian cancers.** *Clinical Cancer Research* 2005; 11: 3686-3704.

Bongers EM, Duijf PH, van Beersum SE, Schoots J, VanKampen A, Burckhardt A, Hamel BC, Losan F, Hoefsloot LH, Yntema HG, Knoers NV, van Bokhoven H. **Mutations in the human TBX4 gene cause small patella syndrome.** *American Journal of Human Genetics* 2004; 74: 1239-1248.

Braybrook C, Doudney K, Marcano AC, Arnason A, Bjornsson A, Patton MA, Goodfellow PJ, Moore GE, Stanier P. **The T- box transcription factor gene TBX22 is mutated in X-linked cleft palate and ankyloglossia.** *Nature Genetics* 2001; 29: 179-183.

Briegel KJ. **Embryonic transcription factors in human breast cancer.** *IUBMB Life* 2006; 58: 123-132.

Brummelkamp TR, Kortlever RM, Lingbeek M, Trettel F, MacDonald ME, van Lohuizen M, Bernards R. **TBX-3, the gene mutated in Ulnar- Mammary Syndrome, is a negative regulator of p19ARF and inhibits senescence.** *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 6567-6572.

Brune K, Hong SM, Li A, Yachida S, Abe T, Griffith M, Yang D, Omura N, Eshleman J, Canto M, Schulick R, Klein AP, Hruban RH, Iacobuzio-Donohue C, Goggins M. **Genetic and epigenetic**

alterations of familial pancreatic cancers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2008; 17: 3536-3542.

Bushdid PB, Brantley DM, Yull FE, Blaeuer GL, Hoffman LH, Niswander L, Kerr LD. **Inhibition of NF-kappaB activity results in disruption of the apical ectodermal ridge and aberrant limb morphogenesis.** *Nature* 1998; 392: 615-618.

Bychkov A, Saenko V, Nakashima M, Mitsutake N, Rogounovitch T, Nikitski A, Orim F, Yamashita S. **Patterns of FOXE1 expression in papillary thyroid carcinoma by immunohistochemistry.** *Thyroid* 2013; 23: 817-828.

C

Cancer Genome Atlas Research Network. **Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma.** *Cell* 2014; 159: 676-690.

Candille SI, Van Raamsdonk CD, Chen C, Kuijper S, Chen-Tsai Y, Russ A, Meijlink F, Barsh GS. **Dorsoventral patterning of the mouse coat by Tbx15.** *PLoS Biology* 2004; 2: e3.

Carreira S, Dexter TJ, Yavuzer U, Easty DJ, Goding CR. **Brachyury-related transcription factor Tbx2 and repression of the melanocyte-specific TRP-1 promoter.** *Molecular cellular biology* 1998; 18: 5099-5108.

Castellano G, Torrisi E, Ligresti G, Malaponte G, Militello L, Russo AE, McCubrey JA, Canevari S, Libra M. **The involvement of the transcription factor Yin Yang 1 in cancer development and progression.** *Cell Cycle* 2009; 8: 1367-1372.

Castellano G, Torrisi E, Ligresti G, Nicoletti F, Malaponte G, Traval S, McCubrey JA, Canevari S, Libra M. **Yin Yang 1 overexpression in diffuse large B-cell lymphoma is associated with B-cell transformation and tumor progression.** *Cell Cycle* 2010; 9: 557-563.

Chelbi ST, Doridot L, Mondon F, Dussour C, Rebourcet R, Busato F, Gascoin-Lachambre G, Barbaux S, Rigourd V, Mignot TM, Tost J, Vaiman D. **Combination of promoter hypomethylation and PDX1 overexpression leads to TBX15 decrease in vascular IUGR placentas.** *Epigenetics* 2011; 6: 247-255.

Chinnappan D, Xiao D, Ratnasari A, Andry C, King TC, Weber HC. **Transcription factor YY1 expression in human gastrointestinal cancer cells.** *International Journal of Oncology* 2009; 34: 1417-1423.

D

D'Elia AV, Tell G, Russo D, Arturi F, Puglisi F, Manfioletti G, Gattei V, Mack DL, Cataldi P, Filetti S, Di Loreto C, Damante G. **Expression and localization of the homeodomain-containing protein HEX in human thyroid tumors.** *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87: 1376-1383.

Deng Z, Wan M, Cao P, Rao A, Cramer SD, Sui G. **Yin Yang 1 regulates the transcriptional activity of androgen receptor.** *Oncogene* 2009; 28: 3746-3757.

Donohoe ME, Zhang X, McGinnis L, Biggers J, Li E, Shi Y. **Targeted disruption of mouse Yin Yang 1 transcription factor results in peri-implantation lethality.** *Molecular and Cellular Biology* 1999; 19: 7237-7244.

Dukers DF, van Galen JC, Giroth C, Jansen P, Sewalt RG, Otte AP, Kluin-Nelemans HC, Meijer CJ, Raaphorst FM. **Unique polycomb gene expression pattern in Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's lymphoma-derived cell lines.** *American Journal of Pathology* 2004; 164: 873-881.

E

Eferl R, Ricci R, Kenner L, Zenz R, David JP, Rath M, Wagner EF. **Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53.** *Cell* 2003; 112: 181-192.

Ell B, Kang Y. **Transcriptional control of cancer metastasis.** *Trends in cell biology* 2013; 23: 603-611.

Escárcega RO, Fuentes-Alexandro S, García-Carrasco M, Gatica A, Zamora A. **The transcription factor nuclear factor-kappa B and cancer.** *Clinical Oncology (Royal College of Radiologists)* 2007; 19: 154-61.

Estour B, Van Herle AJ, Juillard GJ, Totanes TL, Sparkes RS, Giuliano AE, Klandorf H. **Characterization of a human follicular thyroid carcinoma cell line (UCLA RO 82 W-1).** *Virchows Archive. B Cell Pathology Including Molecular Pathology* 1989; 57: 167-174.

F

Fabien N, Fusco A, Santoro M, Barbier Y, Dubois PM, Paulin C. **Description of a human papillary thyroid carcinoma cell line. Morphologic study and expression of tumoral markers.** *Cancer* 1994; 73: 2206-2212.

Fan C, Duhagon MA, Oberti C, Chen S, Hiroi Y, Komuro I, Duhagon PI, Canessa R, Wang Q. **Novel *TBX5* mutations and molecular mechanism for Holt-Oram syndrome.** *Journal of Medical Genetics* 2003; 40: e29.

Farin HF, Bussen M, Schmidt MK, Singh MK, Schuster-Gossler K, Kispert A. **Transcriptional repression by the T-box proteins Tbx18 and Tbx15 depends on Groucho corepressors.** *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282: 25748-25759.

Feinberg AP. **Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease.** *Nature* 2007; 447: 433-440.

Fernández LP, López-Márquez A, Santiesteban P. **Thyroid transcription factors in development, differentiation and disease.** *Nature Reviews of Endocrinology* 2015; 11: 29-42.

Fernando RI, Litzinger M, Trono P, Hamilton DH, Schlom J, Palena C. **The T-box transcription factor Brachyury promotes epithelial-mesenchymal transition in human tumor cells.** *Journal of Clinical Investigation* 2010; 120: 533-544.

G

Gburcik V, Cawthorn WP, Nedergaard J, Timmons JA, Cannon B. **An essential role for Tbx15 in the differentiation of brown and "brite" but not white adipocytes.** *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 2012; 303: e1053-e1060.

Gesta S, Bezy O, Mori MA, Macotela Y, Lee KY, Kahn CR. **Mesodermal developmental gene Tbx15 impairs adipocyte differentiation and mitochondrial respiration.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2011; 108: 2771-2776.

Gesta S, Blüher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, Kralisch S, Blu M, Boucher J, Lewis C, Kahn CR. **Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2006; 103: 6676-6681.

REFERENCIAS

Gesta S, Tseng YH, Kahn CR. **Developmental origin of fat: tracking obesity to its source.** *Cell* 2007; 131: 242-256.

Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT. **Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium.** *Cancer Research* 1952; 12: 264-265.

Gioanni J, Zanghellini E, Mazeau C, Zhang D, Courdi A, Farges M, Lambert JC, Duplay H, Schneider M. **Characterization of a human cell line from an anaplastic carcinoma of the thyroid gland.** *Bulletin Cancer* 1991; 78: 1053-1062.

Gordon S, Akopyan G, Garban H, Bonavida B. **Transcription factor YY1: structure, function and therapeutic implications in cancer biology.** *Oncogene* 2006; 25: 1125-1142.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. **Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.** *Journal of General Virology* 1977; 36: 59-72.

Grubach L, Juhl-Christensen C, Rethmeier A, Olesen LH, Aggerholm A, Hokland P, Ostergaard M. **Gene expression profiling of Polycomb, Hox, and Meis genes in patients with acute myeloid leukaemia.** *European Journal of Haematology* 2008; 81: 112-122.

Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, Jonasson JG, Sigurdsson A, Bergthorsson JT, He H, Blondal T, Geller F, Jakobsdottir M, Magnusdottir DN, Matthiasdottir S, Stacey SN, Skarphedinsson OB, Helgadottir H, Li W, Nagy R, Aguillo E, Faure E, Prats E, Saez B, Martinez M, Eyjolfsson GI, Bjornsdottir US, Holm H, Kristjansson K, Frigge ML, Kristvinsson H, Gulcher JR, Jonsson T, Rafnar T, Hjartarsson H, Mayordomo JI, de la CA, Hrafnkelsson J, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K. **Common variants on 9q22.33 and 14q13.3 predispose to thyroid cancer in European populations.** *Nature Genetics* 2009; 41: 460-464.

H

Hanahan D, Weinberg RA. **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000; 100: 57-70.

Hanahan D, Weinberg RA. **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 2011; 144: 646-674.

Hatcher CJ, Kim MS, Mah CS, Goldstein MM, Wong B, Mikawa T, Basson CT. **TBX5 transcription factor regulates cell proliferation during cardiogenesis.** *Developmental Biology* 2001; 230: 177-188.

Hayden MS, Ghosh S. **Shared Principles in NF- κ B Signaling.** *Cell* 2008; 132: 344-362.

He ML, Chen Y, Peng Y, Jin D, Du D, Wu J, Lu P, Lin MC, Kung HF. **Induction of apoptosis and inhibition of cell growth by developmental regulator hTBX5.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 297: 185-192.

He CQ, Ding NZ, Fan W. **YY1 repressing peroxisome proliferator-activated receptor delta promoter.** *Molecular and Cellular Biochemistry* 2008; 308: 247-252.

Heid IM, Jackson AU, Randall JC, Winkler TW, Qi L, Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Zillikens MC, Speliotes EK, Mägi R, Workalemahu T, White CC, Bouatia-Naji N, Harris TB, Berndt SI, Ingelsson E, Willer CJ, Weedon MN, Luan J, Vedantam S, Esko T, Kilpeläinen TO, Kutalik Z, Li S, Monda KL, Dixon AL, Holmes CC, Kaplan LM, Liang L, Min JL, Moffatt MF, Molony C, Nicholson G, Schadt EE, Zondervan KT, Feitosa MF, Ferreira T, Lango Allen H, Weyant RJ, Wheeler E, Wood AR; MAGIC, Estrada K, Goddard ME, Lettre G, Mangino M, Nyholt DR, Purcell S, Smith AV, Visscher PM, Yang J, McCarroll SA, Nemes J, Voight BF, Absher D, Amin N, Aspelund T, Coin L, Glazer NL, Hayward C, Heard-Costa NL, Hottenga JJ, Johansson A, Johnson T, Kaakinen M, Kapur K, Ketkar S, Knowles JW, Kraft P, Kraja AT, Lamina C, Leitzmann MF, McKnight B, Morris AP, Ong KK, Perry JR, Peters MJ, Polasek O, Prokopenko I, Rayner NW, Ripatti S, Rivadeneira F, Robertson NR, Sanna S, Sovio U, Surakka I, Teumer A, van Wingerden S, Vitart V, Zhao JH, Cavalcanti-Proença C, Chines PS, Fisher E, Kulzer JR, Lecoeur C, Narisu N, Sandholt C, Scott LJ, Silander K, Stark K, Tammesoo ML, Teslovich TM, Timpson NJ, Watanabe RM, Welch R, Chasman DI, Cooper MN, Jansson JO, Kettunen J, Lawrence RW, Pellikka N, Perola M, Vandenput L, Alavere H, Almgren P, Atwood LD, Bennett AJ, Biffar R, Bonnycastle LL, Bornstein SR, Buchanan TA, Campbell H, Day IN, Dei M, Dörr M, Elliott P, Erdos MR, Eriksson JG, Freimer NB, Fu M, Gaget S, Geus EJ, Gjesing AP, Grallert H, Grässler J, Groves CJ, Guiducci C, Hartikainen AL, Hassanali N, Havulinna AS, Herzig KH, Hicks AA, Hui J, Igl W, Jousilahti P, Jula A, Kajantie E, Kinnunen L, Kolcic I, Koskinen S, Kovacs P, Kroemer HK, Krzjelj V, Kuusisto J, Kvaloy K, Laitinen J, Lantieri O, Lathrop GM, Lokki ML, Luben RN, Ludwig B, McArdle WL, McCarthy A, Morcken MA, Nelis M, Neville MJ, Paré G, Parker AN, Peden JF, Pichler I, Pietiläinen KH, Platou CG, Pouta A, Ridderstråle M, Samani NJ, Saramies J, Sinisalo J, Smit JH, Strawbridge RJ, Stringham HM, Swift AJ, Teder-Laving M, Thomson B, Usala G, van Meurs JB, van Ommen GJ, Vatin V, Volpato CB, Wallaschofski H, Walters GB, Widen E, Wild SH, Willemsen G, Witte DR, Zgaga L, Zitting P, Beilby JP, James AL, Kähönen M, Lehtimäki T, Nieminen MS, Ohlsson C, Palmer LJ, Raitakari O, Ridker PM, Stumvoll M, Tönjes A, Viikari J, Balkau B, Ben-Shlomo Y, Bergman RN, Boeing H, Smith GD, Ebrahim S, Froguel P, Hansen T, Hengstenberg C, Hveem K, Isomaa B, Jørgensen T, Karpe F, Khaw KT, Laakso M, Lawlor DA, Marre M, Meitinger T, Metspalu A, Midthjell K, Pedersen O, Salomaa V, Schwarz PE, Tuomi T, Tuomilehto J, Valle TT, Wareham NJ, Arnold AM, Beckmann JS, Bergmann S, Boerwinkle E, Boomsma DI, Caulfield MJ, Collins FS, Eiriksdottir G, Gudnason V, Gyllenstein U, Hamsten A, Hattersley AT, Hofman A, Hu FB, Illig T, Iribarren C,

Jarvelin MR, Kao WH, Kaprio J, Launer LJ, Munroe PB, Oostra B, Penninx BW, Pramstaller PP, Psaty BM, Quertermous T, Rissanen A, Rudan I, Shuldiner AR, Soranzo N, Spector TD, Syvanen AC, Uda M, Uitterlinden A, Völzke H, Vollenweider P, Wilson JF, Witteman JC, Wright AF, Abecasis GR, Boehnke M, Borecki IB, Deloukas P, Frayling TM, Groop LC, Haritunians T, Hunter DJ, Kaplan RC, North KE, O'Connell JR, Peltonen L, Schlessinger D, Strachan DP, Hirschhorn JN, Assimes TL, Wichmann HE, Thorsteinsdottir U, van Duijn CM, Stefansson K, Cupples LA, Loos RJ, Barroso I, McCarthy MI, Fox CS, Mohlke KL, Lindgren CM. **Meta-analysis identifies 13 new loci associated with waist-hip ratio and reveals sexual dimorphism in the genetic basis of fat distribution.** *Nature Genetics* 2010; 42: 949-960.

Hou P, Liu D, Xing M. **Genome-wide alterations in gene methylation by the BRAF V600E mutation in papillary thyroid cancer cells.** *Endocrinology Related Cancer* 2011; 18: 687-697.

Hyde-DeRuyscher RP, Jennings E, Shenk T. **DNA binding sites for the transcriptional activator/repressor YY1.** *Nucleic Acids Research* 1995; 23: 4457-4465.

I

Ito T, Seyama T, Mizuno T, Tsuyama N, Hayashi T, Hayashi Y, Dohi K, Nakamura N, Akiyama M. **Unique association of p53 mutations with undifferentiated but not differentiated carcinomas of the thyroid gland.** *Cancer Research* 1992; 52: 1369-1371.

J

Jacobs JJ, Keblusek P, Robanus-Maandag E, Kristel P, Lingbeek M, Nederlof PM, van Welsem T, van de Vijver MJ, Koh EY, Daley GQ, van Lohuizen M. **Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers.** *Nature Genetics* 2000; 26: 291-299.

Jankovic D, Gorello P, Liu T, Ehret S, La Starza R, Desjobert C, Baty F, Brutsche M, Jayaraman PS, Santoro A, Mecucci C, Schwaller J. **Leukemogenic mechanisms and targets of a NUP98/HHEX fusion in acute myeloid leukemia.** *Blood* 2008; 111: 5672-5682.

Jeon Y, Lee JT. **YY1 tethers Xist RNA to the inactive X nucleation center.** *Cell* 2011; 146: 119-133.

Jiang M, Zhang Y, Fei J, Chang X, Fan W, Qian X, Zhnag T, Lu D. **Rapid quantification of DNA methylation by measuring relative peak heights in direct bisulfite-PCR sequencing traces.** *Laboratory Investigation* 2010; 90: 282-290.

Jochum W, Passequé E, Wagner EF. **AP-1 in mouse development and tumorigenesis.** *Oncogene* 2001; 20: 2401-2412.

Joyce D, Albanese C, Steer J, Fu M, Bouzahzah B, Pestell RG. **NF-kB and cell-cycle regulation: the cyclin connection.** *Cytokine and Growth Factor Reviews* 2001; 12: 73-90.

K

Karin M, Lin A. **NF-kappaB at the crossroads of life and death.** *Nature Immunology* 2002; 3: 221-227.

Kirk EP, Sunde M, Costa MW, Rankin SA, Wolstein O, Castro ML, Butler TL, Hyun C, Guo G, Otway R, Mackay JP, Waddell LB, Cole AD, Hayward C, Keogh A, Macdonald P, Griffiths L, Fatkin D, Sholler GF, Zorn AM, Feneley MP, Winlaw DS, Harvey RP. **Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy.** *American Journal of Human Genetics* 2007; 81: 280-291.

Kispert A, Herrmann B. **The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein.** *The European Molecular Biology Organization journal* 1993; 12: 3211-3220.

Kispert A, Koschorz B, Herrmann B. **The T protein encoded by Brachyury is a tissue specific transcription factor.** *The European Molecular Biology Organization journal* 1995; 14: 4763-4772.

Kretzner L, Blackwood EM, Eisenman RN. **Myc and Max proteins possess distinct transcriptional activities.** *Nature* 1992; 359: 426-429.

Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA. **PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma.** *Science* 2000; 289: 1357-1360.

Kron K, Liu L, Trudel D, Pethe V, Trachtenberg J, Fleshner N, Bapat B, van der Kwast T. **Correlation of ERG expression and DNA methylation biomarkers with adverse clinicopathologic features of prostate cancer.** *Clinical Cancer Research* 2012; 18: 2896-2904.

Kurisaki K, Kurisaki A, Valcourt U, Terentiev AA, Pardali K, TenDijke P, Heldin CH, Ericsson J, Moustakas A. **Nuclear factor YY1 inhibits transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein-induced cell differentiation.** *Molecular and Cellular Biology* 2003; 23: 4494-4510.

L

Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, Gauthier Y, Brue T, Enjalbert A, Drouin J. **A pituitary cell-restricted T-box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins.** *Cell* 2001; 104: 849-859.

Landa I, Boullosa C, Inglada-Pérez L, Sastre-Perona A, Pastor S, Velázquez A, Mancikova V, Ruiz-Llorente S, Schiavi F, Marcos R, Malats N, Opocher G, Diaz-Uriarte R, Santisteban P, Valencia A, Robledo M. **An epistatic interaction between the PAX8 and STK17B genes in papillary thyroid cancer susceptibility.** *PLoS ONE* 2013; 8: e74765.

Landa I, Ruiz-Llorente S, Montero-Conde C, Inglada-Pérez L, Schiavi F, Leskelä S, Pita G, Milne R, Maravall J, Ramos I, Andía V, Rodríguez-Poyo P, Jara-Albarrán A, Meoro A, del Peso C, Arribas L, Iglesias P, Caballero J, Serrano J, Picó A, Pomares F, Giménez G, López-Mondéjar P, Castello R, Merante-Boschin I, Pelizzo MR, Mauricio D, Opocher G, Rodríguez-Antona C, González-Neira A, Matías-Guiu X, Santisteban P, Robledo M. **The variant rs1867277 in FOXE1 gene confers thyroid cancer susceptibility through the recruitment of USF1/USF2 transcription factors.** *PLoS Genetics* 2009; 5: e1000637.

Lang BH, Lo CY, Chan WF, Lam KY, Wan KY. **Prognostic factors in papillary and follicular thyroid carcinoma: their implications for cancer staging.** *Annual Surgery Oncology* 2007; 14: 730-738.

Lausch E, Hermanns P, Farin HF, Alanay Y, Unger S, Nikkel S, Steinwender C, Scherer G, Spranger J, Zabel B, Kispert A, Superti-Furga A. **TBX15 mutations cause craniofacial dysmorphism, hypoplasia of scapula and pelvis, and short stature in Cousin syndrome.** *American Journal of Human Genetics* 2008; 83: 649-655.

Li QY, Newbury-Ecob RA, Terrett JA, Wilson DI, Curtis AR, Yi CH, Gebuhr T, Bullen PJ, Robson SC, Strachan T, Bonnet D, Lyonnet S, Young ID, Raeburn JA, Buckler AJ, Law DJ, Brook JD. **Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family.** *Nature Genetics* 1997 15: 21-29.

Libermann TA, Zerbini LF. **Targeting Transcription Factors for Cancer Gene Therapy.** *Current Gene Therapy* 2006; 6: 17-33.

Libra M, Castellano G, Baritaki S, Huerta-Yepez S, Ligresti G, Militello L, Malaponte G, Stivala F, Canevari S, Bonavida B. **Expression, role in transformation and prognostic significance of the**

transcription factor Yin Yang 1 (YY1) in non-Hodgkin's lymphoma: analyses in NHL tissues by experimental and bioinformatic approaches. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2008; 112: 2827.

Lin JD, Chang HY, Ho YS, Weng HF. **The role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in follicular thyroid cancer cell line CGTH W-1.** *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 1995; 31: 817-821.

Luke MP, Sui G, Liu H, Shi Y. **Yin Yang 1 physically interacts with HOXA11 and represses HOXA11- dependent transcription.** *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281: 33226-33232.

M

Mancikova V, Buj R, Castelblanco E, Ingada-Pérez L, Diez A, de Cubas AA, Curras-Freixes M, Maravall FX, Mauricio D, Matias-Guiu X, Puig-Domingo M, Capel I, Bella MR, Lerma E, Castella E, Reverter JL, Peinado MA, Jorda M, Robledo M. **DNA methylation profiling of well-differentiated thyroid cancer uncovers markers of recurrence-free survival.** *International Journal of Cancer* 2014; 135: 598-610.

Matsumura N, Huang Z, Baba T, Lee PS, Barnett JC, Mori S, Chang JT, Kuo W-L, Gusberg AH, Whitaker RS, Gray JW, Fujii S, Berchuck A, Murphy SK. **Yin Yang 1 modulates taxane response in epithelial ovarian cancer.** *Molecular Cancer Research* 2009; 7: 210-220.

McCune K, Bhat-Nakshatri P, Thorat MA, Nephew KP, Badve S, Nakshatri H. **Prognosis of hormone-dependent breast cancers: implications of the presence of dysfunctional transcriptional networks activated by insulin via the immune transcription factor T-bet.** *Cancer Research* 2010; 70: 685-696.

Mitelman F, Johansson B, Mertens F. **Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer** 2015; <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>

Morris LGT, Sikora AG, Tosteson TD, Davies L. **The increasing incidence of thyroid cancer: the influence of access to care.** *Thyroid* 2013; 23: 885-891.

Mu D. **The Complexity of Thyroid Transcription Factor 1 with Both Pro- and Anti-oncogenic Activities.** *The Journal of Biological Chemistry* 2013; 288: 24992-25000.

Müller CW, Herrmann BG. **Crystallographic structure of the T domain-DNA complex of the Brachyury transcription factor.** *Nature* 1997; 389: 884-888.

N

Naiche LA, Harrelson Z, Kelly RG, Papaioannou VE. **T-box genes in vertebrate development.** *Annual Reviews of Genetics* 2005; 39: 219-239.

Nettore IC, Cacace V, de Fusco C, Colao A, Macchia PE. **The molecular causes of thyroid dysgenesis: a systematic review.** *Journal of Endocrinological Investigation* 2013; 36: 654-664.

Ngan ES, Lang BH, Liu T, Shum CK, So MT, Lau DK, Leon TY, Cherny SS, Tsai SY, Lo CY, Khoo US, Tam PK, Garcia-Barceló MM. **A germline mutation (A339V) in thyroid transcription factor-1 (TTF-1/NKX2.1) in patients with multinodular goiter and papillary thyroid carcinoma.** *Journal of the National Cancer Institute* 2009; 101: 162-175.

de Nigris F, Botti C, de Chiara A, Rossiello R, Apice G, Fazioli F, Fiorito C, Sica V, Napoli C. **Expression of transcription factor Yin Yang 1 in human osteosarcomas.** *European Journal of Cancer* 2006; 42: 2420-2424.

de Nigris F, Rossiello R, Schiano C, Arra C, Williams-Ignarro S, Barbieri A, Lanza A, Balestrieri A, Giuliano MT, Ignarro LJ, Napoli C. **Deletion of Yin Yang 1 protein in osteosarcoma cells on cell invasion and CXCR4/angiogenesis and metastasis.** *Cancer Research* 2008; 68: 1797-1808.

Nishihara E, Nagayama Y, Mawatari F, Tanaka K, Namba H, Niwa M, Yamashita S. **Retrovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene transduction renders human thyroid carcinoma cell lines sensitive to ganciclovir and radiation in vitro and in vivo.** *Endocrinology* 1997; 138: 4577-4583.

Nixon IJ, Shaha AR. **Management of regional nodes in thyroid cancer.** *Oral Oncology* 2013; 49: 671-675.

Nonaka D, Tang Y, Chiriboga L, Rivera M, Ghossein R. **Diagnostic utility of thyroid transcription factors Pax8 and TTF-2 (FoxE1) in thyroid epithelial neoplasms.** *Modern Pathology* 2008; 21: 192-200.

Nowak DE, Tian B, Brasier AR. **Two-step cross-linking method for identification of NF- κ B gene network by chromatin immunoprecipitation.** *BioTechniques*. 2005; 39: 715-725.

O

Oei SL, Shi Y. **Transcription factor Yin Yang 1 stimulates poly(ADP-ribosylation) and DNA repair.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 284: 450-454.

P

Pacifico F, Leonardi A. **NF-kappaB in solid tumors.** *Biochemical Pharmacology* 2006; 72: 1142-1452.

Pacifico F, Leonardi A. **Role of NF-kappaB in thyroid cancer.** *Molecular and Cellular Endocrinology* 2010; 321: 29-35.

Pacifico F, Mauro C, Barone C, Crescenzi E, Mellone S, Monaco M, Chiappetta G, Terrazzano G, Liguoro D, Vito P, Consiglio E, Formisano S, Leonardi A. **Oncogenic and anti-apoptotic activity of NF-kappa B in human thyroid carcinomas.** *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 54610-54619.

Palena C, Plev DE, Tsang KY, Fernando RI, Litzinger M, Krukovskaya LL, Baranova AV, Kozlov AP, Schlom J. **The human T-box mesodermal transcription factor Brachyury is a candidate target for T-cell-mediated cancer immunotherapy.** *Clinical Cancer Research* 2007; 13: 2471-2478.

Paxton C, Zhao H, Chin Y, Langner K, Reecy J. **Murine Tbx2 contains domains that activate and repress gene transcription.** *Genes & Development* 2002; 283: 117-124.

Peres J, Davis E, Mowla S, Bennett DC, Li JA, Wansleben S, Prince S. **The highly homologous T-box transcription factors, TBX2 and TBX3, have distinct roles in the oncogenic process.** *Genes & Cancer* 2010; 1: 272-282.

Placzkowski KA, Reddi HV, Grebe SK, Eberhardt NL, Mclver B. **The role of the PAX8/PPARγ fusion oncogene in thyroid cancer.** *PPAR Research* 2008, 672829.

Plageman TF, Yutzey KE. **Differential expression and function of Tbx5 and Tbx20 in cardiac development.** *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 19026-19034.

Postma AV, Alders M, Sylva M, Bilardo CM, Pajkrt E, van Rijn RR, Schulte-Merker S, Bulk S, Stefanovic S, Ilgun A, Barnett P, Mannens MM, Moorman AF, Oostra RJ, van Maarle MC. **Mutations in the T (brachyury) gene cause a novel syndrome consisting of sacral agenesis,**

abnormal ossification of the vertebral bodies and persistent notochordal canal. *Journal of Medical Genetics* 2014; 51: 90-97.

Prince S, Carreira S, Vance KW, Abrahams A, Goding CR. **Tbx2 directly represses the expression of the p21WAF1 cyclin-dependent kinase inhibitor.** *Cancer Research* 2004; 64: 1669-1674.

Puppin C, Puglisi F, Pellizzari L, Manfioletti G, Pestrin M, Pandolfi M, Piga A, Di Loreto C, Damante G. **HEX expression and localization in normal mammary gland and breast carcinoma.** *BMC Cancer* 2006; 6: 192.

Q

Qi T, Han J, Cui Y, Zong M, Liu X, Zhu B. **Comparative proteomic analysis for the detection of biomarkers in pancreatic ductal adenocarcinomas.** *Journal of Clinical Pathology* 2008; 61: 49-58.

R

Rodriguez M, Aladowicz E, Lanfrancone L, Goding CR. **Tbx3 represses E-cadherin expression and enhances melanoma invasiveness.** *Cancer Research* 2008; 68: 7872-7881.

Romitti M, Ceolin L, Siqueira D, Ferreira C, Wajner S, Maia A. **Signaling pathways in follicular cell-derived thyroid carcinomas.** *International Journal of Oncology* 2013; 42: 19-28.

Rowley M, Grothey E, Couch FJ. **The role of Tbx2 and Tbx3 in mammary development and tumorigenesis.** *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2004; 9: 109-118.

S

Sakhinia E, Glennie C, Hoyland JA, Menasce LP, Brady G, Miller C, Radford JA, Byers RJ. **Clinical quantitation of diagnostic and predictive gene expression levels in follicular and diffuse large B-cell lymphoma by RT-PCR gene expression profiling.** *Blood* 2007; 109: 3922-3928.

Schönberger J, Bauer J, Spruss T, Weber G, Chahoud I, Eilles C, Grimm D. **Establishment and characterization of the follicular thyroid carcinoma cell line ML-1.** *Journal of Molecular Medicine* 2000; 78: 102-110.

Seligson D, Horvath S, Huerta-Yepez S, Hanna S, Garban H, Roberts A, Shi T, Liu X, Chia D, Goodglick L, Bonavida B. **Expression of transcription factor Yin Yang 1 in prostate cancer.** *International Journal of Oncology* 2005; 1: 131-141.

Shi Y, Seto E, Chang LS, Shenk T. **Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein.** *Cell* 1991; 67: 377-388.

Shi Y, Lee J, Galvin K. **Everything you have ever wanted to know about Yin Yang 1...** *Biochimica et Biophysica Acta* 1997; 1332: f49-f66.

Shortt J, Johnstone RW. **Oncogenes in cell survival and cell death.** *Cold Spring Harbour Perspectives in Biology* 2012; 4: a009829.

Sigal A, Rotter V. **Oncogenic Mutations of the p53 Tumor Suppressor: The Demons of the Guardian of the Genome.** *Cancer Research* 2000; 60: 6788-6793.

Sinha S, Abraham S, Gronostajski RM, Campbell CE. **Differential DNA binding and transcription modulation by three T-box proteins, T, TBX1 and TBX2.** *Gene* 2000; 258: 15-29.

Singh MK, Petry M, Haenig B, Lescher B, Leitges M, Kispert A. **The T-box transcription factor Tbx15 is required for skeletal development.** *Mechanisms of Development* 2005; 122: 131-144.

Sparrow DB, McInerney-Leo A, Gucey ZS, Gardiner B, Marshall M, Leo PJ, Chapman DL, Tasic V, Shishko A, Brown MA, Duncan EL, Dunwoodie SL. **Autosomal dominant spondylocostal dystosis is caused by mutation in TBX6.** *Human Molecular Genetics* 2013; 22: 1625-1631.

Stennard FA, Costa MW, Elliot DA, Rankin S, Haast SJ, Lai D, McDonald LP, Niederreither K, Dolle P, Bruneau BG, Zorn AM, Harvey RP. **Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2.5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart.** *Developmental Biology* 2003; 262: 206-224.

Sui G, Affar el B, Shi Y, Brignone C, Wall NR, Yin P, Donohoe M, Luke MP, Calvo D, Grossman SR, Shi Y. **Yin Yang 1 is a negative regulator of p53.** *Cell* 2004; 117: 859-872.

T

Tanaka J, Ogura T, Sato H, Datano M. **Establishment and biological characterization of an in vitro human cytomegalovirus latency model.** *Virology* 1987; 161: 62-72.

REFERENCIAS

Tran Cao HS, Johnston LE, Chang DC, Bouvet M. **A critical analysis of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) staging system for differentiated thyroid carcinoma in young patients on the basis of the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) registry.** *Surgery* 2012; 152: 145-151.

Tremplus CS, Wei S, Humble MM, Dang H, Carl D, Sifre MI, Kissling GE, Sunman J, Akiyama SK, Roberts D, Tucker CJ, Chun K, Tennant RW. **A novel role for the T-box transcription factor Tbx1 as a negative regulator of tumor cell growth in mice.** *Molecular Carcinogenesis* 2012; 50: 981-991.

U

Uscheva A, Shenk T. **TATA binding protein-independent initiation: YY1, TFIIB and RNA polymerase II direct basal transcription on supercoiled template DNA.** *Cell* 1994; 76: 1115-1121.

V

Vance KW, Carreira S, Brosch G, Goding CR. **Tbx2 is overexpressed and plays an important role in maintaining proliferation and suppression of senescence in melanomas.** *Cancer Research* 2005; 65: 2260-2268.

Venza I, Visalli M, Tripodo B, De Grazia G, Loddo S, Teti D, Venza M. **FOXE1 is a target for aberrant methylation in cutaneous squamous cell carcinoma.** *British Journal of Dermatology* 2010; 162: 1093-1097.

Venza I, Visalli M, Tripodo B, Lentini M, Teti D, Venza M. **Investigation into FOXE1 genetic variations in cutaneous squamous cell carcinoma.** *British Journal of Dermatology* 2010; 162: 681-683.

W

Wan M, Huang W, Kute TE, Miller LD, Zhang Q, Hatcher H, Wang J, Stovall DB, Russell GB, Cao PD, Deng Z, Wang W, Zhang Q, Lei M, Torti SV, Akman SA, Sui G. **Yin Yang 1 plays an essential role in breast cancer and negatively regulates p27.** *American Journal of Pathology* 2012; 180: 2120-2133.

Wang CC, Tsai MF, Dai TH, Hong TM, Chan WK, Chen JJ, Yang PC. **Synergistic activation of the tumor suppressor, HLJ1, by the transcription factors YY1 and activator protein 1.** *Cancer Research* 2007; 67: 4816-4826.

Wang ZQ, Grigoriadis AE, Mohle-Steinlein U, Wagner EF. **A novel target cell for c-fos-induced oncogenesis: development of chondrogenic tumours in embryonic stem cell chimeras.** *The EMBO journal* 1991; 10: 2437-2450.

Wansleben S, Peres J, Hare S, Goding CR, Prince S. **T-box transcription factors in cancer biology.** *Biochimica et Biophysica Acta* 2014; 1846: 380-391.

Wilson V, Conlon F. **The T-box family.** *Genome biology* 2002; 3: reviews3008-reviews3008.7.

Wong RS. **Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment.** *Journal of Experimental Clinical Cancer Research* 2011; 30: 87.

Wu S, Shi Y, Mulligan P, Gay F, Landry J, Liu H, Lu J, Qi HH, Wang W, Nickoloff JA, Wu C, Shi Y. **A YY1-INO80 complex regulates genomic stability through homologous recombination-based repair.** *Nature Structural & Molecular Biology* 2007; 14: 1165-1172.

X

Xiao G, Fu J. **NFkB and cancer: a paradigm of Yin-Yang.** *American Journal of Cancer Research* 2011; 1: 192-221.

Xing, M. **Gene methylation in thyroid tumorigenesis.** *Endocrinology* 2007; 148: 948-953.

Xing M. **Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer.** *Nature Reviews Cancer* 2013; 13: 184-199.

Xu H, Morishima M, Wylie JN, Schwartz RJ, Bruneau BG, Lindsay EA, Baldini A. **Tbx1 has a dual role in the morphogenesis of the cardiac outflow track.** *Development* 2004; 131: 3217-3227.

Y

Yagi H, Furutani Y, Hamada H, Sasaki T, Asakawa S, Minoshima S, Ichida F, Joo K, Kimura M, Imamura S, Kamatani N, Momma K, Takao A, Nakazawa M, Shimizu N, Matsuoka R. **Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome.** *Lancet* 2003; 362: 1366-1373.

Yang L, Lin M, Ruan W, Dong L, Chen E, Wu X, Ying K. **Nkx2-1: a novel tumor biomarker of lung cancer.** *Journal of Zhejiang University Science B* 2012; 13: 855-866.

Yao YL, Dupont BR, Ghosh S, Fang Y, Leach R, Seto E. **Cloning, chromosomal localization and promoter analysis of the human transcription factor YY1.** *Nucleic Acids Research* 1998; 26: 3776-3783.

Yao YL, Yang WM, Seto E. **Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation.** *Molecular and Cellular Biology* 2001; 21: 5979-5791.

Yasuhiko Y, Haraguchi S, Kitajima S, Takahashi Y, Kanno J, Saga Y. **Tbx6- mediated Notch signaling controls somite-specific Mesp2 expression.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 2006; 103: 3651-3656.

Yu J, Ma X, Cheung KF, Li X, Tian L, Wang S, Wu CW, Wu WKK, He M, Wang M, Ng SSM, Sung JJY. **Epigenetic inactivation of T-box transcription factor 5, a novel tumor suppressor gene, is associated with colon cancer.** *Oncogene* 2010; 29: 6464-6474.

Z

Zaravinos A, Spandidos DA. **Yin yang 1 expression in human tumors.** *Cell Cyle* 2010; 9: 512-522.

Zhang P, Zuo H, Nakamura Y, Nakamura M, Wakasa T, Kakudo K. **Immunohistochemical analysis of thyroid-specific transcription factors in thyroid tumors.** *Pathology International* 2006; 56: 240-245.

Zhang Q, Stovall D, Inoue K, Sui G. **The oncogenic role of Yin Yang 1.** *Critical reviews in oncogenesis* 2011; 16: 163-197.

Zong M, Meng M, Li Liang. **Low expression of TBX4 predicts poor prognosis in patients with stage II pancreatic ductal adenocarcinoma.** *International Journal of Molecular Science* 2011; 12: 4953-4963.

GRACIAS...

Diré muchos nombres (mentira, sabéis que soy incapaz de recordar demasiados) y seguro que me dejaré muchos otros, pero ahí va (aviso, es un poco “ñoño” tot plegat)...

Empezaré por Antonia, gracias por darme la oportunidad de realizar esta tesis, por tus consejos y amabilidad en todo momento.

Por supuesto que, gracias a toda la gente del departamento y laboratorio con la que he convivido, la que estuvo y la que está, gente con la que he compartido días de trabajo y momentos únicos. Las jornadas se habrían hecho duras sin los cafés de la escalera (tirados como gatos), comidas (molábamos más cuando íbamos al PAŞ), calçotadas (incluso a -3°C!), paellas, afterworks... gracias por las conversaciones, los vetos, los bucles,... por todo: Cristian, Lara, Miri, Maria, Lara, Alba, Max, Leo, Gerard, Pau,... y, aquí van, tus “especial acholotxements” (a pesar que no me hayas hecho NUNCA un p*** western...) gràcies Cristian! per MOLT.

I would like to express my earnest gratitude to Antonio Leonardi and his entire lab, especially to Dom, for the opportunity to share those months with you, for all that I learnt, for all your help and for making me feel part of the group from the first day... thank you for everything.

Como no, agradecer a Daniel Grinberg y a Susanna Balcells, fueron ellos los que me permitieron probar esto de la investigación cuando aún andaba por la Diagonal.

A toda la gente de Barcelona: Laura ja saps que ets la persona amb el cor més gran que existeix al planeta i t'estimo tant! gràcies per tots aquells moments, per recordar-me les dates d'entrega i per aconsellar-me amb el seny que a mi em faltava, quin equip feiem!, Ismaaaaaael, por ser mi amigo (sin contrato) y compañero de conciertos, gràcies a tota la “biofamily del hall” (sabeu que em resulta molt cursi aquest nom...) per compartir aquells moments de classes/pràctiques/cafès/dinars/festes...

Gracias a la gente de Marto, porque crecí con vosotros, y a pesar de que pase el tiempo podemos hablar como si fuera ayer: Marta te mereces lo mejor, Ferran sigue siendo tú mismo, Laura aquí estamos para lo que sea,...

A Fabián, porque los duros inicios fueron contigo.

Gràcies a l'esport, en especial al waterpolo, sense ell no hauria coincidit amb l'Anna, qui ho anava a dir, fer-me amiga d'una colla de freakis matemàtics... ;) Tampoc hagués conegut a la Shannon... gràcies per aguantar-me quan sóc inaguantable...! Tinc tantes coses a dir de vosaltres que això seria infinit i em fa mandreta, així que ja sabeu que us estimo molt, gràcies per estar allà sempre!

Gràcies Jordi pel Nepal, pels sopars, els passejos i excursions, les curses, els Cafès,... gràcies per TOT lo que m'has aportat!

A les muntanyes, a l'aire lliure, al mar, al cel i a les estrelles,...

Gracias a mi familia, a mis padres, por toda la paciencia que han tenido y tienen conmigo. Por apoyarme, aún sin entender bien bien qué he estado haciendo estos años en los que salía temprano por la mañana y no aparecía hasta la noche. A mi hermanito, de su hermanaza, por ese corazón tan grande que tienes! Para ti Ringo... no tengo palabras, sólo un MIAU.

Finalmente quería disculparme, así en general, por si alguna vez os he puesto alguna cara un poco "rara" (llamémosla así), no iba con ánimo de ofender ni molestar.

"It feels good to be lost in the right direction"

Watch the early morning sun
Drip like blood from the day
See the busy people run
So many games to play
See the blue suburban dream
Under the jet plane sky
Sleep away and dream a dream
Life is just a lullaby

Oh and everything will flow
Oh you know everything will flow
Oh...

Watch the day begin again
Whispering into the night
See the pretty people play
Hurrying under the light
A million cars, a million trains,
Under the jet plane sky
Nothing lost and nothing gained
Life is just a lullaby

Oh, and everything will flow
Oh, i said everything will flow
Oh, you know everything will flow
Oh...

Oh, and everything will flow
Oh, you know everything will flow
Oh...

The neon lights in the night tonight
Will say "everything will flow"
The stars that shine in the open sky
Will say "everything will flow"
The lovers kissed with an openness
Will say "everything will flow"
The cars parked in the hypermarket
Know "everything will flow"

(Everything will flow.
Suede, 1999)