BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Identificación del promotor mínimo de la variante V3 del gen *ST3GAL4*

Tesis que para obtener el título de:

Licenciado en Biotecnología

PRESENTA:

JONATAN MICHAEL REYES PINEDA

DIRECTORA:

D. EN C. LORENA MILFLORES FLORES

CO-DIRECTORA:

D. EN C. LAURA PATRICIA MARTÍNEZ MORALES

OCTUBRE 2019

“Hay más cosas en el Cielo y en la Tierra de las que pueda soñar tu filosofía”
William Shakespeare

Agradecimientos:

La primera parte de este trabajo se realizó en el laboratorio de Biología Molecular y Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

La segunda parte de este trabajo se realizó en las instalaciones, del laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Oriente del Instituto Mexicano del Seguro Social.

A la Dra. Lorena Milflores Flores por darme esta oportunidad de realizar esta tesis, su apoyo y todas sus enseñanzas.

A la Dra. Laura Patricia Martínez Morales por su apoyo en la realización, su comprensión, paciencia, y tutoría durante la realización de esta tesis.

A la Dra. Verónica Vallejo Ruiz por su apoyo y orientación durante el desarrollo de esta tesis.

Dedicatoria

En primer lugar, le agradezco a mis padres por haberme apoyado durante todo mi trayecto universitario, tanto de forma económica como emocional, por siempre darme aliento, y guía en las situaciones difíciles.

A mis abuelos por siempre creer en mi, y por sus palabras de aliento, por ser un pilar de apoyo e inspiración, para avanzar cada día en la universidad.

A mi hermana que me dio la inspiración y la motivación para realizarme como profesionista, para brindarle un apoyo en su futuro.

A mi prima Alejandra Ixchel Reyes por su apoyo emocional aun estando en otro estado, por siempre animarme y ayudarme a persistir cada día.

A mis tías Perla Ruth Pineda y Lizet Pineda, por animarme cada en cada etapa de mi vida universitaria, por los mejores consejos de vida, y por siempre desear lo mejor para mi vida.

A mi tío Marco Gamboa, por ser una inspiración y guía pues el también estudio en Biotecnología, y fue una motivación para mi realización como profesionista.

A mis primos Aldo Gamboa, Alain Gamboa y Martin Gamboa, por ayudarme a relajarme en los momentos más tensos, fueron un apoyo para olvidar las dificultades de la carrera.

A mi mejor amigo Bernardo Chumacero Ávila por toda su amistad desde primaria, por siempre esta ahí en momentos difíciles, tanto escuchando problemas como dando buenos consejos.

A Eduardo Medina González por ser un gran amigo durante toda carrera aun estando, estudiando en un área diferente, por siempre platicar de ciencia en muchos días.

A mi tutor Sergio Juárez del Carmen por su guía en el trayecto académico, por sus enseñanzas que fueron de mucho apoyo para avanzar en diversas materias.

Al profesor Víctor Hugo de Gante por ser un consejero para durante el trayecto académico.

A mis amigos de carrera Lucia Peña, Guadalupe Meza, María José Vega, Carmen Olmedo, Bruno Paz, Arnulfo Limón, Raúl Pacheco, Iván Lima, Marisela Coyotl, Aurora Rodríguez, por su amistad, su confianza, por los momentos que pasamos en la carrera, siempre los recordare.

A mis amigos del laboratorio de biología molecular y microbiología de la BUAP, Ricardo Monterrosas, Kenia Tapia, Jesús Aparicio, Marytere Gil, con los cuales pasé momentos muy divertidos y me dieron grades enseñanzas.

A mis compañeros del CIBIOR, Ile, Rosy, Pily, por su compañerismo, sus enseñanzas y conocimiento.

A la Dra. Lorena Milflores Flores, por su apoyo, por todas sus enseñanzas, su guía, y su gran amistad.

A la Dra. Laura Patricia Martínez Morales, por sus enseñanzas, paciencia, por haberme permitido su apoyo, y darme una gran orientación en la realización de esta tesis.

Resumen

El gen *ST3GAL4,* codifica para la enzima ST3GAL IV, la cual cataliza la transferencia de ácido siálico a una estructura final tipo Galβ1,4GlcNAc, esta enzima participa en la síntesis del antígeno Sialil Lewis X (sLe (x)), el cual se ha encontrado incrementado en diversos tipos de cáncer. Se ha encontrado alteraciones en la expresión de ARNm del gen *ST3GAL 4* en diversos tipos de cáncer, dependiendo del tipo histológico, este gen cuenta con mas de un promotor, lo cual indica una regulación compleja, en el grupo de trabajo, se encontró una isoforma de ARNm que previamente no se encontraba reportada, esta isoforma de la variante V3, que se detectó en líneas celulares HaCat, SiHa, HeLa y C33A. Además, también se realizaron estudios de actividad de promotor de la variante V3, evaluando la actividad de cuatro fragmentos de 1735 pb, 685pb, 484 pb, y de 209 pb, sin embargo, no se logró determinar el promotor mínimo, pero se demostró que en el fragmento de 209 pb no presentaba actividad de promotor, por lo que el objetivo de este trabajo fue identificar el promotor mínimo de la variante V3 del gen *ST3GAL 4,* para lo cual se evaluó la actividad de tres fragmentos que se encuentran entre la región comprendida entre los fragmentos de 484 pb y el de 209 pb. Para ello, se realizó un análisis *in silico* mediante herramientas bioinformáticas con el objetivo de identificar los sitios de unión a factores de transcripción, y se seleccionaron solamente los pertenecientes a humano, entre los que se encuentran SP1 (Specificity Protein 1), VDR (Vitamin D Receptor), AP-1 (Activator Protein 1), los cuales pueden estar involucrados en la regulación de la transcripción. Finalmente se evaluó la actividad de tres fragmentos de promotor con un tamaño de 375 pb, 353 pb y 209 pb en la línea celular HaCat, obteniendo que el fragmento de 316 pb como promotor mínimo, al ser el último en mantener la actividad de promotor y contener los elementos necesarios para el reclutamiento de la maquinaria transcripcional.

ÍNDICE

Introducción ……..……9
Glicosilación……9
Ácidos siálicos y sialilación ……..……...10
Sialiltransferasas……12
Subfamilia α2,6-Gal……12
Subfamilia α2,6-sialiltransferasa a GalNAc……..13
Subfamilia α2,8 sialiltransferasas……..……13
Subfamilia α 2,3 sialiltransferasas……..……...13
Sialiltransfersas en cáncer……..……14
Antecedentes……15
Expresión de gen *ST3GAL4* en cáncer: ……..……15
Gen *ST3GAL4*……..……15
Justificación……..19
Planteamiento del problema……20
Objetivos……21
Hipótesis……22
Metodología……..23
Análisis *in silico*……..23
Diseño de oligonucleótidos……...…….…23
Amplificación de fragmentos del promotor V3 del gen *ST3GAL4*…..……...…24
Plásmidos……..25
Clonación……...……...…26
Línea celular HaCat……..……...…28
Ensayos de transfección……..……28
Resultados……..……31
Caracterización del fragmento de promotor 484 pb de la isoforma V3 del gen *ST3GAL4*……31
Generación de deleciones del fragmento 484 pb……..……31
Actividad de promotor……..……36
Discusión……..……...37

Conclusiones……..……42
Perspectivas……43
Bibliografía……44
Anexos……50

INTRODUCCIÓN

Glicosilación

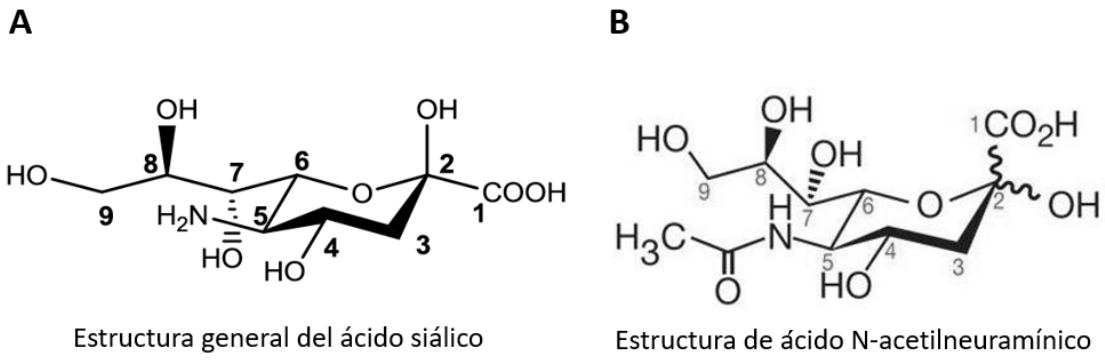
La glicosilación es un proceso enzimático que se lleva acabo principalmente en retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi de células eucariotas. Este consiste en la adición de moléculas de polisacáridos, oligosacáridos, o monosacáridos a proteínas, lípidos u otros carbohidratos; al producto de este proceso se le denomina glicoconjugado (Bloom et al. 2004). Estos glicoconjugados participan en el reconocimiento de señales sobre la superficie celular, interacciones célula - célula y célula – matriz extracelular (Vajaria et al. 2015).

En el caso de la glicosilación de proteínas, el proceso enzimático comienza en el citosol, continua en el retículo endoplasmático y termina en el aparato de Golgi. La acción coordinada de las enzimas glicosiltransferasas y glicosidasas, genera glicoproteínas con polisacáridos formados de glucosa (Glc), galactosa (Gal), manosa (Man), fucosa (Fuc), *N*-acetilglucosamina (GlcNac), *N*-acetilgalactosamina (GalNac) y ácido *N*-acetilneuramínico o ácido siálico (Sia) (Freeze y Aebi, 2005; Pérez et al. 2015). Existen varios tipos de glicosilación de proteínas, sin embargo, los principales son, la *N*-glicosilación y la *O*-glicosilación, se diferencian dependiendo del tipo del enlace que se genera entre el residuo de aminoácido y el carbohidrato aceptor (Freeze y Aebi, 2005). En el caso de la *N*-glicosilación, existe una unión entre un residuo de asparagina (N) de la cadena polipeptídica con un carbohidrato. Mientras que en la *O*-glicosilación, el enlace se produce entre un grupo hidroxilo de los residuos de serina (S) o treonina (T) del polipéptido con un carbohidrato. La nueva cadena polipeptídica modificada por *N* u *O* glicosilación continua con modificaciones en el aparato de Golgi donde ocurre un proceso que se denomina “glicosilación-terminal”. Durante este proceso, la adición secuencial de carbohidratos genera cadenas lineales o ramificadas de residuos de monosacáridos. Uno de estos procesos terminales es la adición de ácido siálico a

la posición terminal de la cadena del N u O glicano; a este proceso se le denomina sialilación (Freeze y Aebi, 2005).

Ácidos siálicos y sialilación

A nivel molecular, los Sia (Figura 1A) comprenden una familia de 43 monosacáridos, derivados del ácido neuramínico, (5-amino-3,5-didesoxi-D-glicero-D-galacto-nono-2-ulsónico) y cuenta con nueve carbonos con grupos funcionales específicos (Schauer, 1982; Wang y Miller, 2003). Una de las ramas de Sia es la N-acetilada, la cual forma los ácidos *N*-acetilneuramínicos (Neu5Ac, NANA)(Figura 1B), los cuales son la forma más extendida de los Sia y la que más se presenta en humanos (Figura 1) (Schauer, 1982; Wang y Miller, 2003).



Estructura general del ácido siálico

Estructura de ácido N-acetilneuramínico

Figura 1. Estructura química del ácido siálico (A) y del ácido N-acetilneuramínico (B).

Los Sia se encuentran en la superficie de todo tipo de células en las posiciones terminales de glicoconjugados (Bauer y Osborn, 2015). Su importancia biológica radica en que influyen en la estructura y función de glicoconjugados y pueden ser ligando en lectinas y anticuerpos; además de que se ha observado que median procesos de interacción celular (Figura 2) (Bauer y Osborn, 2015). También median interacciones célula-célula, glicano-célula, patógeno-célula y de debido a su carga electronegativa, median funciones de repulsión en interacciones célula-célula (Bauer y Osborn, 2015).

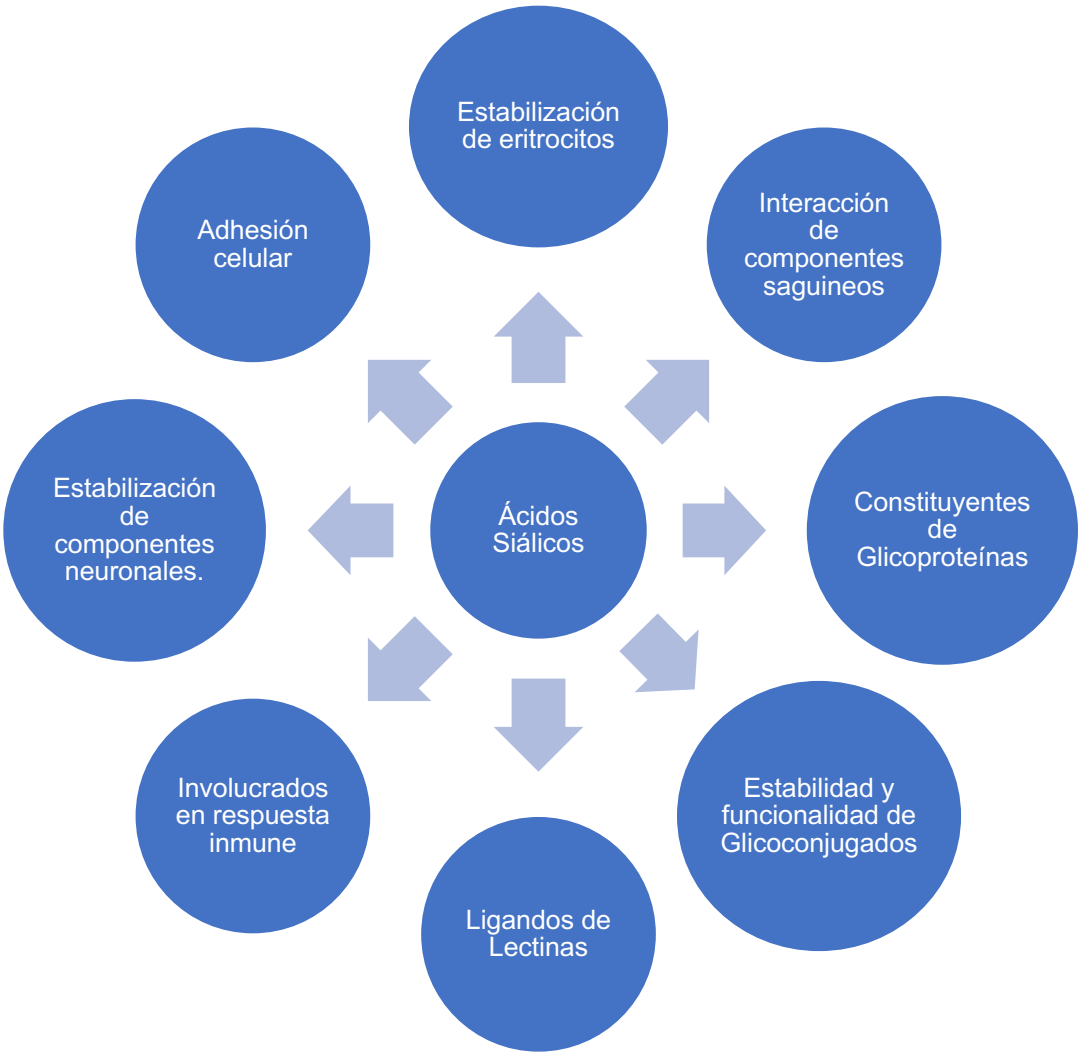


Figura 2. Procesos en que se encuentran involucrados los ácidos siálicos

Los Sia se pueden encontrar en las regiones terminales de los *N* u *O* glicanos enlazados a residuos de Gal en las posiciones α−2,3 ó α-2,6. También se pueden encontrar unidos a residuos de *N*-acetil galactosamina en el enlace α-2,6 y a residuos de otros Sia por medio del enlace α-2,8. Estos tipos de enlaces son catalizados por enzimas denominadas sialiltranferasas, que emplean un azúcar donador como sustrato (Schauer, 1982; Wang y Miller, 2003). Estas enzimas transfieren el Sia de una molécula citidin-monofosfato hacia un grupo hidroxilo aceptor (Schauer, 1982; Wang y Miller, 2003)

Sialiltransferasas

Hasta el momento se han descrito veinte enzimas sialiltransferasas en mamíferos, de las cuales, quince han sido clonadas en humano. Las sialiltransferasas se agrupan en subfamilias (Tabla 1) dependiendo del tipo de enlace que lleven a cabo y del tipo de carbohidrato aceptor, así pueden ser Gal, GlcNac y GalNAc (Harduin et al. 2001; Ress y Linhardt, 2004) Estas enzimas se localizan en aparato de Golgi y son proteínas integrales de membrana (Wang et al. 2015).

Tabla 1. Sialiltransferasas de humano que han sido clonadas

Sialiltransferasa	Glicoconjugado sobre el cual actúa
ST3Gal-I	*O*-glicano
ST3Gal-II	*O*-glicano
ST3Gal-III	*O*-glicano, *N*-glicano
ST3Gal-IV	*O*-glicano, *N*-glicano
ST3Gal-V	Glicolípido
ST3Gal-VI	*N*-glicano, Glicolípido
ST6Gal-I	*N*-glicano
ST6Gal-II	*N*-glicano
ST6GalNAc-I	*O*-glicano
ST6GalNAc-II	*O*-glicano
ST6GalNAc-III	*O*-glicano
ST6GalNAc-IV	*O*-glicano
ST6GalNAc-V	Glicolípido
ST6GalNAc-VI	Glicolípido
ST8Sia-I	Glicolípido
ST8Sia-II	*N*-glicano
ST8Sia-III	*N*-glicano
ST8Sia-IV	*N*-glicano
ST8Sia-V	Glicolípido
ST8Sia-VI	Ácido siálico en *O*-glicano

Subfamilia α6-sialiltransferasa

En esta familia se encuentra la ST6Gal I, la cual media la transferencia de un residuo de Sia en posición α-2,6 a un residuo terminal de galactosa de disacárido tipo 2

(Gal1-4GlcNAc), esta sialiltransfersas no puede catalizar en estructuras denominadas de tipo 1 (Gal1-3GlcNAc) o tipo 3 (Gal1-3GalNAc) como un sustrato aceptor (Harduin et al. 2001).

Subfamilia α-2,6-sialiltransferasa a GalNAc

Las enzimas ST6GalNAc I, II y IV son los tres miembros de esta subfamilia, los cuales catalizan la transferencia de Sia en una posición α-2,6 en residuos de GalNAc (Harduin et al. 2001).

Subfamilia α-2,8-sialiltransferasa

Esta subfamilia contiene a seis miembros los cuales van de la ST8SIA I-VI, las cuales están involucradas en la sialilación de α-2,8 de gangliósidos, también son responsables de la biosíntesis de GD3 (Disialodihexosylganglioside) a partir de GM3 (Monosialodihexosylganglioside), también catalizan la polimerización de los residuos de ácido α-2,8-siálico en las estructuras GD3 (Neu5Acα2- 3 (6) Galβ1-4GlcNAc) encontradas en los *N*-glicanos (Teintenier et al. 2005).

Subfamilia α-2,3-sialiltransferasas

Esta familia se encuentra integrada por seis miembros, los cuales van de ST3GalI a ST3Gal VI, los cuales se han encontrado en tejidos humanos, pero con una especificidad diferente de sustrato (Harduin et al. 2001). Las ST3Gal I y ST3Gal II median la transferencia de Sia a un residuo de Gal, en posición terminal Gal 1-3GalNAc en glicolípidos y glucoproteínas (Harduin et al. 2001). La sialiltransferasa ST3Gal III cataliza la transferencia de Sia a una cadeda tipo dos (Gal 1-4GlcNAc), se ha encontrado que se encuentra altamente expresada en músculo esquelético (Harduin et al. 2001).

Sialiltransfersas en cáncer

Los perfiles de sialilación se encuentran alterados en cáncer (Tabla 2) (Munkley y Elliott, 2016; Vajaria et al. 2015), estas alteraciones pueden provocar una sialilación adicional en los *N*-Glicanos (Hipersialilación), o producción de *O*-Glicanos truncados con sialilación prematura (Bauer y Osborn 2015). Un ejemplo de esto, es que en células cancerosas se caracterizan por tener altos niveles de glicanos sialilados (Vajaria et al. 2015). Los altos niveles de glicanos sialilados, incrementan las cargas negativas, lo cual interrumpe la adhesión celular ya que promueve el desprendimiento de las células de la masa tumoral mediante repulsión electrostática (Munkley y Elliott, 2016). Otro ejemplo, es el incremento de la síntesis del antígeno sLe (x) (Neu5Acα2-3Galβ1-4[Fucα1-3]GlcNAcβ); este antígeno promueve la adhesión de las células tumorales con las células endoteliales, lo que facilita la migración y la diseminación de células cancerosas, lo cual conduce a metástasis y formación de tumores (Cohen et al. 2019). Estos fenotipos pueden deberse a la expresión irregular de sialiltransferasas que genera cambios en los patrones de sialilación (Marth y Grewal, 2008). Así, el estudio de la expresión estas enzimas y de la regulación de su expresión es importante, ya que la expresión alterada de estas enzimas puede tener consecuencia en la sialilación aberrante y en el comportamiento celular (Wang et al. 2015).

Tabla 2: Ejemplos de alteración de la expresión del ARNm o proteína de sialiltranferasas en cáncer

Sialiltransferasa	Tipo de Cáncer	Expresión alterada:	Referencias:
ST3 Gal III	Cáncer gástrico	ARNm incrementada	Gretschel et al. 2003
ST6 Gal I	Cáncer gástrico	ARNm incrementada	Gretschel et al. 2003
ST3 Gal IV	Cáncer Cervicouterino	ARNm disminuida	Roa et al. 2018
ST6 Gal I	Cáncer Cervicouterino	ARNm incrementada	Lópezet al. 2009
ST3 Gal IV	Cáncer Gástrico	Enzima incrementada	Seiichi et al. 2002

ANTECEDENTES

Expresión de gen *ST3GAL4* en cáncer

El gen *ST3GAL4* codifica para la enzima β-galactósido α-2,3-sialiltransferasa 4 (ST3GAL IV). Esta enzima cataliza la transferencia de Sia a una estructura final tipo Galβ1,4GlcNAc. La importancia biológica, es que participa en la síntesis del sLe (x) que se encuentra incrementado en diversos tipos de cáncer (Cohen et al. 2019).

La expresión del ARNm de este gen, se encuentra alterada en distintos tipos de cáncer. Por ejemplo, en cáncer cervicouterino y cáncer de riñón su expresión esta disminuida, mientras que en cáncer gástrico y lesiones de cuello uterino esta incrementada (Tabla 3). La expresión de este gen parece ser compleja ya que contiene varios promotores que pueden estar activos dependiendo del tipo histológico (Peng et al. 2001; Colomb et al. 2016; Roa et al. 2018).

Tabla 3: Expresión del ARNm de *ST3Gal4* en diferentes tipos de cáncer.

Modelo	Alteración ARNm	Referencia
Lesiones de cuello uterino	Aumenta	Dolores et al. 2009
Cáncer gástrico	Aumenta	Jun et al. 2012
Carcinoma renal	Disminuye	Saito et al. 2002
Cáncer cervical	Disminuye	Peng et al. 2001
Cancer colorrectal	Sin cambios	Petretti et al. 1999

Gen *ST3GAL4*

El gen *ST3GAL4*, se encuentra ubicado en la región q24.2 del cromosoma 11 de la, cuenta con un tamaño alrededor de 84 kb y contiene 17 exones (Figura 3) (Kitagawa y Paulson, 1993) (NCBI, 2019).

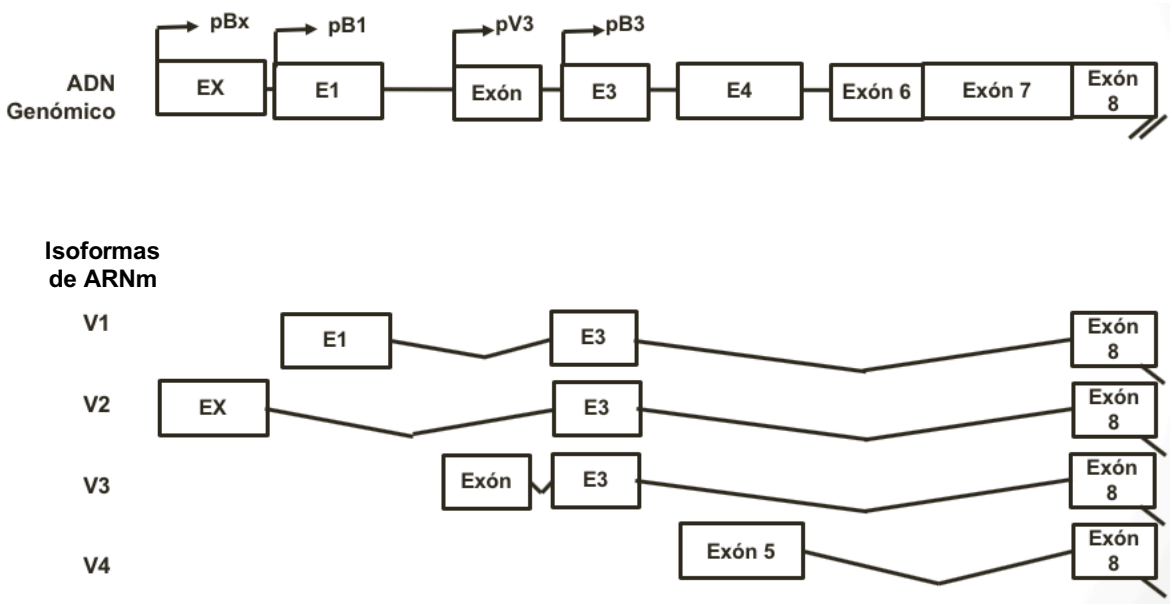


Figura 3. Estructura del gen *ST3GAL4* actualizada, en el que se muestran sus exones, los promotores y las isoformas de ARNm para las que codifica cada promotor.

La regulación de este gen es compleja, ya que tiene por lo menos 5 promotores: pBX (pV2), pB1 (pV1), pB2, pB3 (pV4) y pA que codifican para 4 isoformas de ARNm, respectivamente: V2, V1, B2 y V4 (Figura 3) (Colomb et al. 2016).

En el grupo de trabajo se realizó un alineaminto del gen *ST3GAL4* en el que se encontró un cambio en los nombres reportados en el Genbank, pasando de las isoformas "B" a las isoformas "V" (Figura 4), también se encontró el ARNm de la isoforma V3 que previamente no se encontraba reportada (Roa et al. 2018).

Nomenclatura actual de las variantes de ARNm.	Isoformas **B** reportadas por Kitagawa *et al.*	Tamaño de transcrito.	Isoforma proteica y numero de aceso.
V1 NM-006278	B1	2053 b	Isoforma 1 NP_006269
V2 NM-001254757	Bx	1854 b	Isoforma 2 NP_001241686
V3 NM-001254758	-	1727 b	Isoforma 2 NP_001241687
V4 NM-001254759	B3	1871 b	Isoforma 3 NP_001241688
-	B2	-	-

Figura 4. Isoformas de ARNm del gen *ST3GAL4* actualmente reportadas en NCBI (Figura tomada de Roa et al. 2018).

En la base de datos NCBI, esta reportada la isoforma isoforma V3 y datos previos del grupo de trabajo (Roa et al; 2018), reportaron la presencia de esta isoforma en las líneas celulares HaCaT, SiHa y HeLa (Figura 5). Sin embargo, está isoforma de encuentra ausente en la línea celular C33A, sugiriendo que su expresión puede ser regulada de forma distinta en este tipo celular.

Debido a ello y a que no se había reportado el promotor de la isoforma V3, el grupo de investigación identificó y caracterizó el promotor de dicha isoforma. En el grupo de trabajo se evaluó la actividad del promotor V3, en líneas celulares HaCat (Ortiz, 2017).

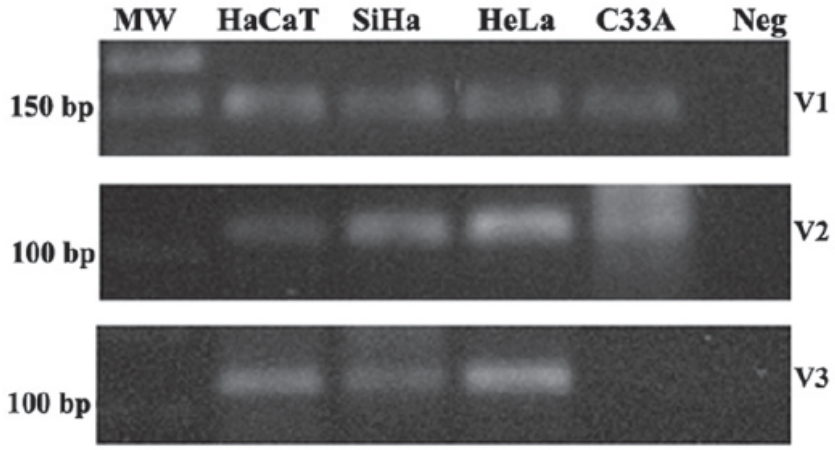


Figura 5: Gel de agarosa que muestra los ARNm de las isoformas V1, V2 y V3 en líneas celulares (Roa et al. 2018).

Con el fin de identificar y caracterizar el promotor de la isoforma V3, se evaluó la actividad de estas regiones, las cuales consisten en deleciones de bases de la región 5´ del promotor completo de 1735 pb. Así se evaluó la actividad de promotor de una región de 684 pb, otra de 484 pb y una de 209 pb. Las dos primeras regiones mostraron actividad similar a la del promotor completo (Figura 6), sin embargo, la región de 209 pb, no mostró actividad. Estos datos sugieren que el tamaño del promotor V3 fdel gen *ST3GAL4* que mantuvo la actividad, se localiza entre las regiones de 484 pb y 209 pb (Ortiz, 2017).

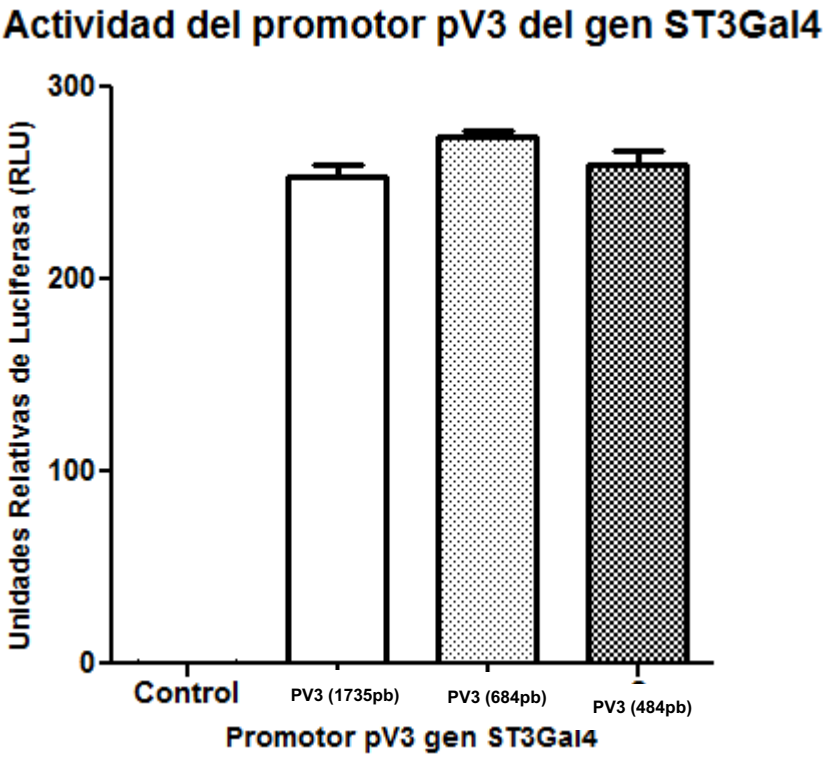


Figura 6: Graficas de actividad de construcciones de la isoforma V3 del gen *ST3GAL 4* evaluadas en línea celular HaCat. (Ortiz, 2017)

JUSTIFICACIÓN

En cáncer la expresión de la sialiltransferasa ST3GALIV se encuentra alterada, esta enzima es codificada por el gen ST3GAL4, el cual transcribe para mas de una isoforma de ARNm que son producto de sus diferentes promotores y de splicing alternativo. Recientemente se ha identificado la isoforma V3 de ARNm que previamente no se encontraba descrita.

Aunque se han realizado estudios con el fin de identificar y caracterizar el promotor mínimo de la isoforma V3, aun se desconocen los elementos que pueden estar involucrados en el mantenimiento de actividad transcripcional.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el grupo de investigación se identificó la secuencia de aproximadamente 1735 pb, como promotor de la isoforma V3 del gen ST3GAL 4 presentando actividad transcripcional, se le realizaron deleciones apartir de 5` obteniendo fragmentos de 684 pb, 484 pb, y 209 pb, de las cuales, las secuencias de 684 pb y 484 pb mostraron actividad de promotor similar a la del promotor completo, sin embargo la secuencia de 209 pb carece de actividad de promotor.

Así para la realización de este trabajo, se plantean las siguientes preguntas de investigación:

-¿Cuál es el promotor mínimo de la variante V3 del gen *ST3GAL4*?

-¿Qué elementos son necesarios para mantener la actividad transcripcional del promotor V3 del gen *ST3GAL4*?

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Identificar el promotor mínimo de la isoforma V3 del gen *ST3GAL 4*.

Objetivos específicos:

- Evaluar la actividad de diferentes fragmentos de promotor que se localicen entre la región 484pb y 209pb de la isoforma V3 del gen *ST3GAL 4*.
- Identificar los elementos de promotor necesarios para mantener la actividad de promotor de la isoforma V3 del gen *ST3GAL4*.

HIPÓTESIS

El promotor mínimo de la variante V3 del gen ST3GAL4, se localiza en la región comprendida entre las posiciones -44 pb y -528 pb .

METODOLOGÍA

Análisis *in silico*

Se realizó la búsqueda de la secuencia genética del gen *ST3GAL4* de *Homo sapiens* en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information). Posteriormente se empleó el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), con el fin de comprobar que la secuencia con la que se estaba trabajando previamente correspondía al gen *ST3GAL4*.

Se empleó el programa bioinformático Eukaryotic Promoter Database (EPD) (https://epd.epfl.ch//index.php) el cual realiza la búsqueda de secuencias de promotores en células eucarióticas, con el fin de mantenerse actualizado en cuanto a la preservación de la región promotora previamente identificada.

Una vez que se obtuvo la secuencia, se realizó una búsqueda de los posibles elementos de unión a factores de transcripción por medio de la herramienta bioinformática Patch 1.0, que se encuentra en la base de datos de Gene Regulation, la cual utiliza los datos de la base de datos de factores de transcripción eucarióticos TRANSFAC (Transcription Factor). Esta herramienta permite predecir los sitios de unión a factores de transcripción. Se seleccionaron los sitios de unión a factores de transcripción pertenecientes a humano y que presentaban una identidad del 100%. Asimismo, se buscaron dentro de la secuencia elementos como cajas TATA, cajas GC, sitios INR (Initiator element) y elementos descendentes de promotor (DPE), los cuales son elementos básicos para identificar las regiones promotoras.

Diseño de oligonucleótidos

Empleando el programa FastPCR, se diseñaron oligonucleótidos delanteros, que se emplearon para la clonación de tres fragmentos que se localizan entre los fragmentos pV3(484 pb) y pV3 (209 pb), los cuales se observan en la Tabla 4,

previamente ya se tenía el oligonucleótido reverso (Ortiz, 2017), el diseño incluyó sitios de corte para enzimas de restricción para digerir el producto de PCR:

Tabla 4: Secuencias de oligonucleótidos y sus enzimas de restricción.

Nombre de oligonucleótido	No. PB	Secuencia	Enzima de restricción	Posición
ST3Gal4 pV3 Fc1 (375 pb)	22	GGCTTTGCTCGAGCCCTTTATG	*Xho* I	Delantero
ST3Gal4 pV3 Fc2 (353 pb)	22	CTCAGAGCTCGAGCAGCAATGT	*Xho* I	Delantero
ST3Gal4 pV3 Fc3 (316 pb)	21	GAAAGGTACCATGTTGTCTTG	*Kpn* I	Delantero
ST3Gal4 pV3 Rv	23	CCTCTGACGCCAAAGCTTTTTCC	*Hind* III	Reverso

Amplificación de fragmentos del promotor V3 del gen ST3Gal4

Se amplificaron tres fragmentos del promotor de la isoforma V3 de 375 pb, 353 pb y 316 pb, por medio de PCR punto final; para ello se utilizó como templado fragmento de pV3ST3 GAL4 (484 pb) obtenido previamente en el grupo de trabajo.

Las condiciones de PCR fueron 95 ºC por 1 minuto para la fase de desnaturalización, 58 ºC por 1 minuto para la fase de alineamiento y 72 ºC por 2 minutos para la fase de extensión, por 40 ciclos.

El contenido de las reacciones de amplificación se preparó con: 5 µL de Master Mix de la marca Thermo Fisher, 1 µL de oligonucleótido delantero (10 mM/ µL), 1 µL de Oligonucleótido reverso (10 mM/ µL), 0.5 µL de DNA templado, 2.5 µL de H_2O estéril grado molecular.

Para observar el producto de la amplificación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% de agarosa teñido con 1.1 µL de Midori Green Advance DNA Stain (Nippon Genetics). Se utilizó el marcador de peso molecular de 100pb (Axigen) para determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos. Las condiciones de la electroforesis fueron un tiempo de corrimiento de 35 minutos a 100V. La

visualización de los resultados de la electroforesis fue en un transiluminador de mesa (UVP).

Plásmidos

Para clonar los fragmentos se empleó el plásmido pGL4.12[*luc2CP*] (Figura 7) (Promega). Este plásmido es un vector que contiene el marco de lectura para la enzima luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*), y carece de una región promotora. Río arriba de este gen, se localiza un sitio de clonación múltiple, que permite la clonación de secuencias promotoras, de forma que, en presencia de un promotor, se expresara la enzima luciferasa. También, contiene un gen que confiere resistencia a Ampicilina, el cual permite la selección de clonas de bacterias que porten el plásmido tras una transformación.

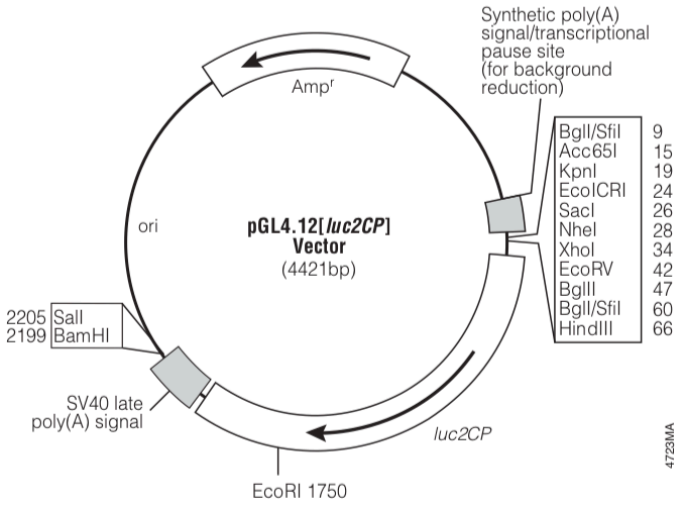


Figura7: Estructura del plásmido vector pGL 4.12[*luc2CP*]

Por otro lado, también se empleó el plásmido pGL4.72[*hRlucCP*] (Figura 8) (Promega) para los ensayos transfección descritos mas adelante. Este plásmido contiene un gen que codifica para la enzima luciferasa de *Renilla reniformis,* esta enzima difiere de forma estructural a la luciferasa de *Photinus pyralis*, y en el sustrato que utiliza para producir luminiscencia.

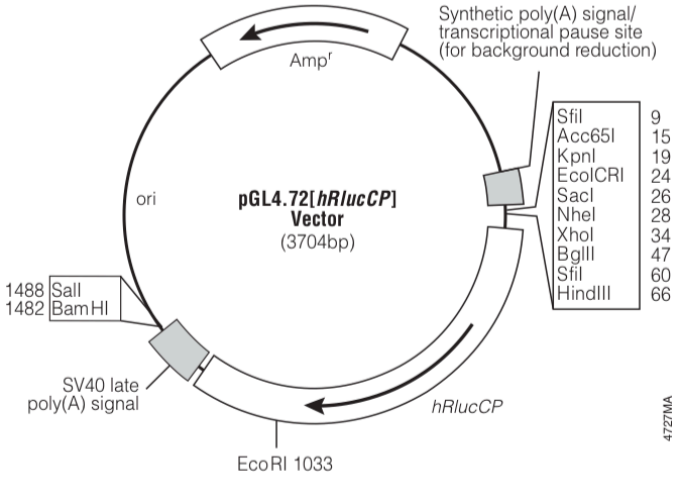


Figura 8: Estructura del plásmido pGL4.72[*hRlucCP*]

Clonación

Se realizó una restricción en los extremos de los tres fragmentos amplificados y en el vector pGL4.12, empleando las enzimas de restricción correspondientes (Tabla 4). Los fragmentos 375 pb y 353 pb se escindieron con nucleasas *Xho* I y *Hind* III (Thermo Scientific), mientras que el fragmento de 316 pb se trato con las enzimas *Kpn* I y *Hind* III (Thermo Scientific), así como también al vector con las enzimas correspondientes para cada producto de PCR. La reacción se realizó como se muestra en la Tabla 5:

Tabla 5. Condiciones de restricción.

	Inserto(ng/µL)	**Vector(ng/µL)**
Tipo de ADN	12	1.5
Xho I	1	1
Hind III	1	1
Buffer	2	2
H_2O	4	14.5
Total	20	20

La reacción se incubó a 37 ºC por 3 horas. Para confirmar el ensayo de restricción, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los fragmentos obtenidos, se

cortaron y purificaron del gel de agarosa, utilizando el kit Gel DNA Recobery kit de Zymo Research y se siguieron las instrucciones del proveedor.

A continuación, los fragmentos se ligaron en el vector pGL4.12, utilizando la enzima T4 DNA Ligase (Thermo Scientific), se incubaron a 22ºC durante tres horas y a 4ºC durante la noche. El resultado de la ligación se utilizó para transformar bacterias *E.coli* Top 10 químicamente competentes tratadas con Cloruro de calcio al 0.1 M y fueron transformadas mediante choque térmico. Se seleccionaron las unidades formadoras de colonias (UFC), usando un medio selectivo con Ampicilina, que portaran el vector y se crecieron para realizar con ellas una miniprep (Extracción de plasmido de un cultivo) con el fin de obtener los plásmidos, empleando el kit Zippy Plasmid Miniprep de la marca Zimo Research, para la extracción de plásmido y se siguieron las instrucciones del proveedor.

Para comprobar que los fragmentos se clonaron en el vector, se realizó una PCR punto final, utilizando los oligonucleótidos ST3Gal4 pV3 Fc1 (375 pb) y ST3Gal4 pV3 Rv para la construcción pV3 ST3GAL4(375 pb), pV3 Fc1 (353 pb) y ST3Gal4 pV3 Rv para la construcción pV3 ST3GAL4(353 pb) y pV3 Fc1 (316 pb) y ST3Gal4 pV3 Rv para la construcción pV3 ST3GAL4(316 pb) y mediante electroforesis en gel de agarosa se confirmó la generación de construcciones pV3 ST3GAL4 (375 pb), pV3 ST3GAL4(353 pb), pV3ST3GAL4(316 pb) (Tabla 4).

Las condiciones de PCR fueron 95 ºC por 1 minuto para la fase de desnaturalización, 58 ºC por 1 minuto para el alineamiento y 72 ºC por 2 minutos para la fase extensión, por 40 ciclos.

El contenido de las reacciones de amplificación se preparon con: 5 µL de Master Mix de la marca Thermo Fisher, 1 µL de oligonucleótido delantero (10 Mm), 1 µL de oligonucleótido reverso (10 Mm), 0.5 µL de DNA templado, 2.5 µL de H_2O estéril grado molecular.

Posteriormente, se procedió a realizar una extracción plasmídica a gran escala con el kit *NucleoBond Xtra plasmid purification Maxi*, con el objetivo de extraer una gran cantidad de plásmido con un alto grado de concentración, y así emplearlo en los ensayos de transfección. En la Tabla 6 se muestran las concentraciones de las extracciones, que se obtuvieron en (ng/μL), por extracción se emplearon dos tubos.

Tabla 6. Concentraciones de las extracciones de plásmido Maxi.

Nombre de plásmido	No. Tubo	Concentración (ng/μL)
pGL4.12 V3 (375 pb) [4746pb]	1	768
	2	323
pGL4.12 V3 (353 pb) [4724pb]	1	2198
	2	1968
pGL4.12 V3 (316 pb) [4671pb]	1	1234
	2	1722

Línea celular HaCat

La línea celular HaCat son queratinocitos humanos inmortalizados no tumorales, obtenida de un hombre de 62 años. Debido a que esta línea celular expresa la isoforma V3 del gen *ST3GAL4* se utilizó para los ensayos de medición de actividad de promotor.

Ensayos de transfección

Para realizar los ensayos de transfección se sembraron 80,000 células en cada pocillo de placas P24 y se cultivaron en medio DMEM sin antibiótico, con 10% de SFB a una temperatura de 37 ºC con una atmósfera de 5% de CO_2 por un tiempo de 24 horas.

Pasadas 24 horas, y con una confluencia del 80%, las células se co-transfectaron con las construcciones y el vector pGL4.72 (Figura 9), empleando el kit *Lipofectamine 3000* (Thermo Fisher).

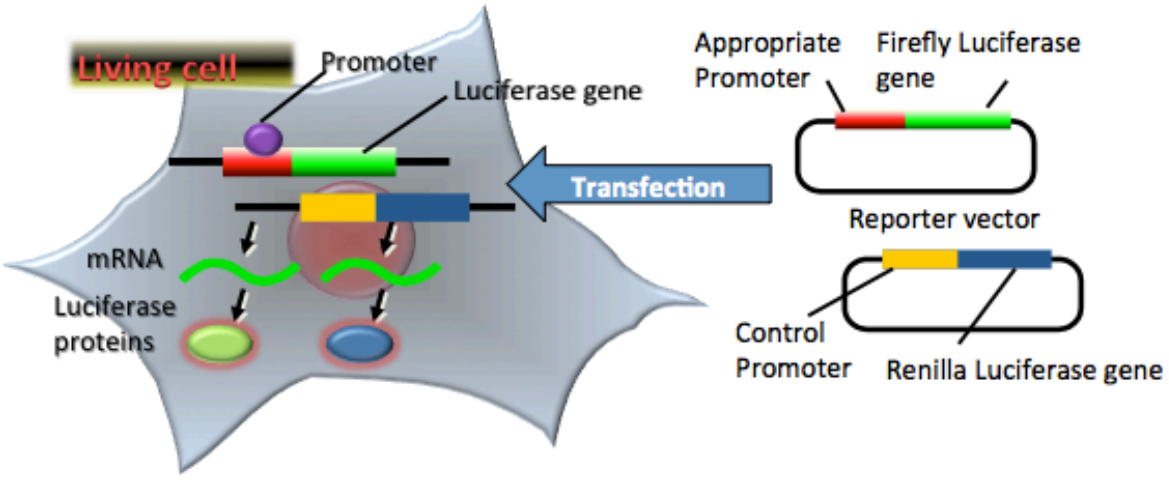


Figura 9: Esquema de co-transfección, en el que se un vector reportero junto con un vector control, con el fin de medir la actividad de promotor por medio del ARNm que expresan.

Se co-transfectaron 600 ng de construcción junto con 20 ng del vector pGL4.72 (Tabla 7), para lo cual se agregaron en un tubo eppendorf, junto con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (sin suero fetal bovino y sin antibiótico), y con el reactivo p3000, estos tubos se mezclaron con tubos que contenían lipofectamina y se dejaron reposar a temperatura ambiente por 5 min. Los complejos plasmídicos con lipofectamina, se adicionaron a cada pocillo, estos ensayos fueron realizados por triplicado:

Tabla 7. Condiciones de transfección

Construcción	Plásmido	Ng
pV3 L(1735 pb)	pGL4.72	20 ng
	pV3 L(1735 pb)	600 ng
pV3 S(482 pb)	pGL4.72	20 ng
	pV3 S(482 pb)	600 ng
pV3(375 pb)	pGL4.72	20 ng
	pV3(375 pb)	600 ng
pV3(353 pb)	pGL4.72	20 ng
	pV3(353 pb)	600 ng
pV3(316 pb)	pGL4.72	20 ng
	pV3(316 pb)	600 ng

Transcurridas 24 horas después de la transfección, se les realizó a las células tres lavados con PBS 1X (Phosphate Buffered Saline), y se lisaron en buffer de lisado PBL (Passive Lysis Buffer) durante dos horas a temperatura ambiente en agitación. Completado el lisado celular, se tomaron 20 µL del lisado celular y se midió la luminiscencia emitida tras añadir el sustrato correspondiente a cada luciferasa. Así primero, se añadió 20 µL de buffer LAR II (Luciferase Assay Reagent II) para la medición de la actividad de Luciferasa (*Photinus pyralis)* y después se añadió 20 µL de solución *Stop and Glow*; esta solución detiene la actividad de esta luciferasa y secuencialmente comienza la actividad de la luciferasa de *Renilla reniformis*; las lecturas se llevaron a cabo en el luminometro Glomax 20/20 (Fig. 10).

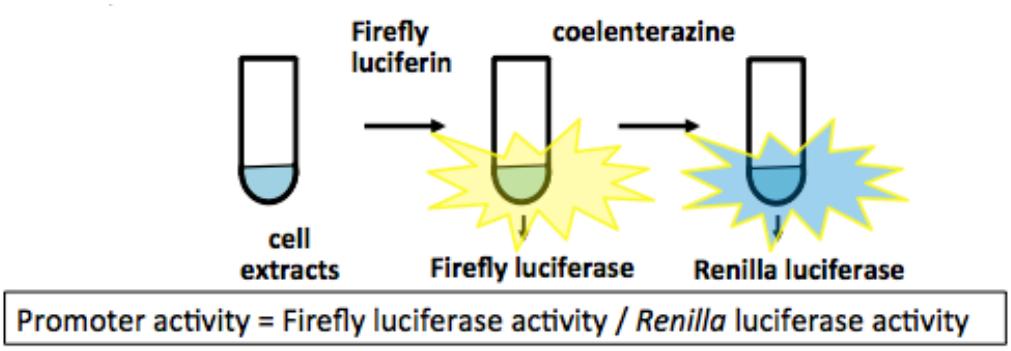


Figura 10: Esquema de la reacción que se realiza para la lectura de actividad del promotor clonado.

Los resultados obtenidos en los estudios de expresión se realizaron por triplicado, estos fueron promediados y graficados, también se les realizó la prueba T de Student.

RESULTADOS

Caracterización del fragmento de promotor 484 pb de la isoforma V3 del gen *ST3GAL4*

Los resultados obtenidos mediante el programa de TRANSFAC arrojaron mas de 300 sitos de unión a factores de transcripción, de los cuales se seleccionaron los correspondientes a *Homo sapiens* y los que contaban con una coincidencia del 100% (Anexo 1).

El fragmento de promotor de 484 pb, cuenta con sitios de unión a factores de transcripción como Sp1, VDR, Gamma-CAAT, C-Myb (Myeloblastosis), CP1 (Ceft Palate 1), AP-1, E2F, CACC, GR y TNF-α (Tumor Necrosis Factor Alpha), en los se pueden unir elementos que pueden estar regulando la actividad de promotor. También cuenta con elementos DPE, sitios INR y TFIID (Figura 12).

Generación de deleciones del fragmento 484 pb

Considerando los datos anteriores se diseñaron oligonucleótidos específicos para generar deleciones en el extremo 5´ del fragmento 484 pb (Figura 12). Así se generaron 3 fragmentos, uno de 375 pb (Figura 11), otro de 353 pb y otro de 316 pb, debido a lo siguiente:

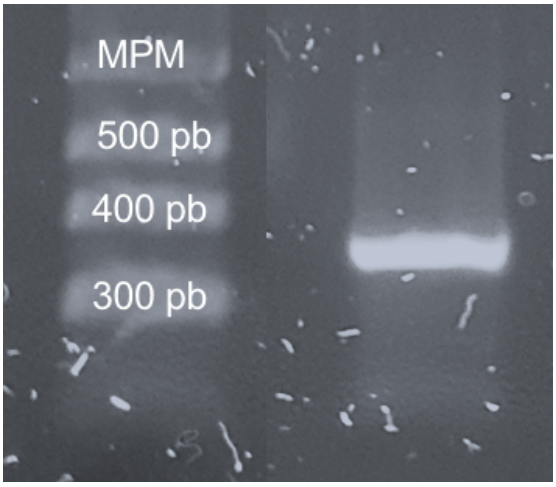


Figura 11: Amplificación del fragmento de 375 pb.

En el fragmento de 375 pb se eliminaron los sitios de unión a factores DPE, VDR, Sp1, ICP4 (Infected cell Polypeptide 4), c-Myb, NF-1 (Nuclear Factor 1), AP-1 y RAR-alpha 1(Retinoic acid receptor alpha), de los cuales el elemento DPE se ha visto que es un elemento de promotor, mientras que los demas pueden estar mediando la actividad de promotor, con respecto al fragmento de 484 pb. En el fragmento de 353 pb se eliminaron los sitios del promotor que son unión para factores TFIID, TCF-E4 (T Cell Factor) y VDR, entre los que podemos destacar TFIID el cual recluat la maquinaria transcripcional, con respecto a 375 pb. Finalmente, en el fragmento 316 pb se eliminaron los sitios de unión Sp1, CTCF (CCCTC-binding factor), AML 1 (Acute Myeloid Leukemia 1), Sp2 (Specificity Protein 2), Sp3 (Specificity Protein 3) y Sp4 (Specificity Protein 4), con respecto a 353 pb. Para el fragmento de 209 pb, en el cual ya no se observó actividad trancripcional de promotor, y al analizar este fragmento, notamos que se eliminó los sitios de unión a NF-1, DPE, ISGF (Interferon stimulated gene factor), CTCF, Sp1, AP-2 (Activator Protein 1), c-Myb, FXR (Farnesoid X Receptor), VDR, CACCC y c-Ets, con respecto a pV3(316 pb), los cuales pudieran estar participando en la actividad transcripcional del promotor V3, como se observa en la figura 12.

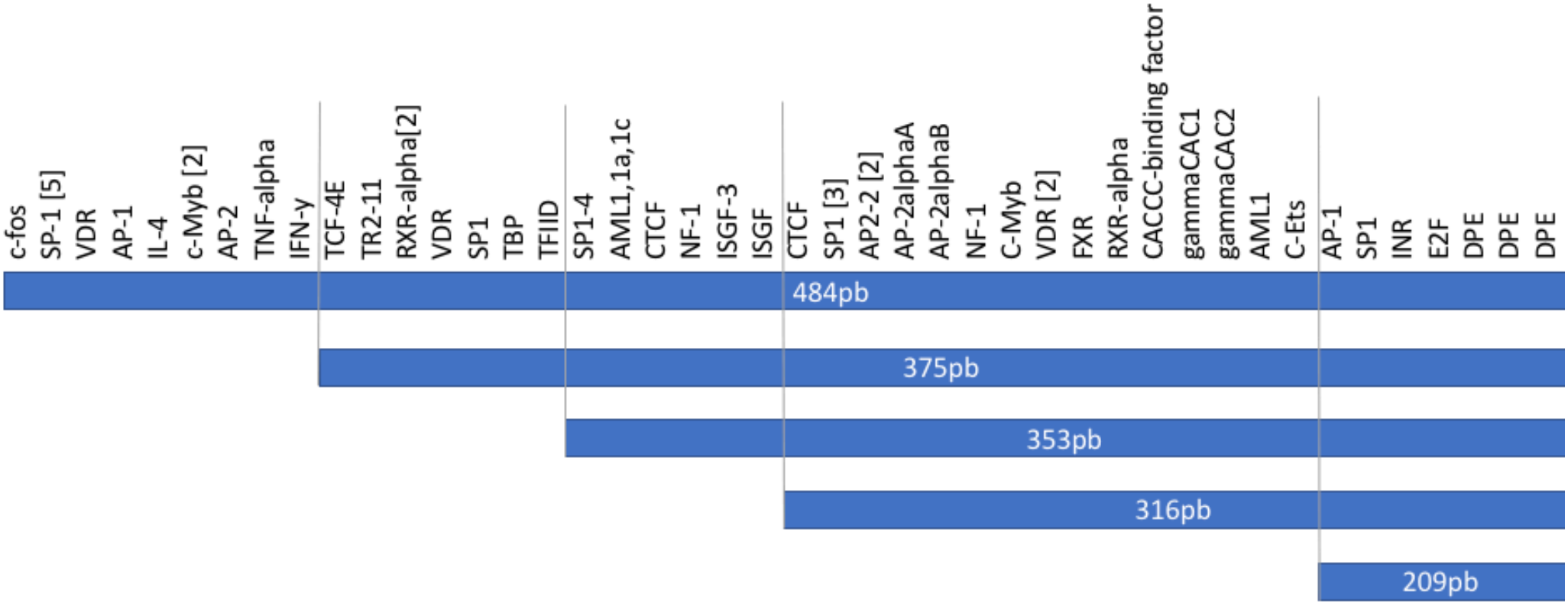


Figura 12: Se observa los sitios de unión a factores de transcripción que conserva cada construcción.

Una vez obtenidas las construcciones, se realizó una PCR punto final, con el fin de confirmar que los fragmentos se habían insertado en el vector pGL 4.12. En la figura 13 , se muestra el gel de electroforesis de esta PCR. Donde se observa un fragmento de aproximadamente 375 pb en el carril 1, en el carril 2 un fragmento de 353 pb y en el carril 3 un fragmento de 316 pb, junto a los marcadores de peso molecular (Figura 13).

Los fragmentos obtenidos mediante PCR se clonaron en el vector pGL 4.12 (Figura 14) obteniendo así las siguientes construcciones:

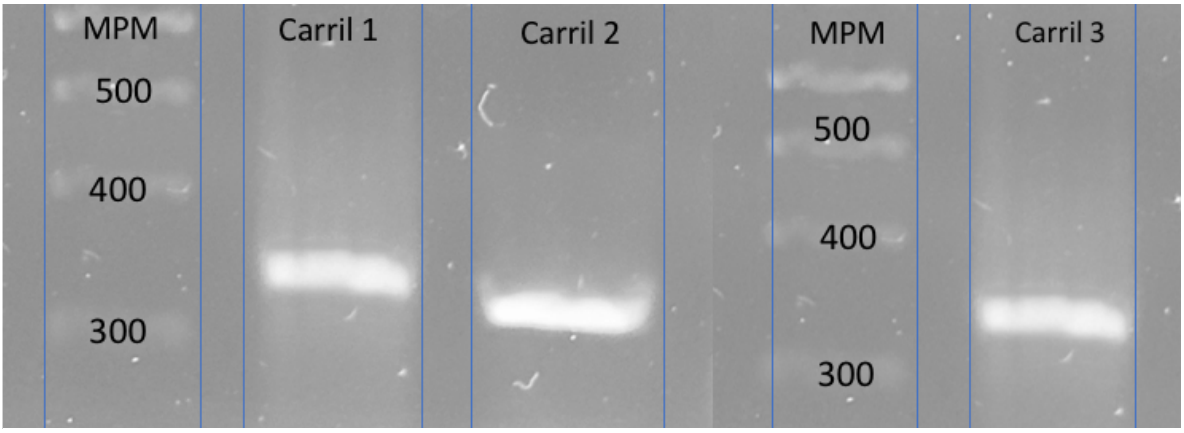


Figura: 13: Geles de electroforesis, el carril 1 corresponde a pV3(375 pb), el carril 2 a pV3(353 pb), y el carril 3 a pV3(316 pb), todas junto al marcador de peso molecular (MPM)

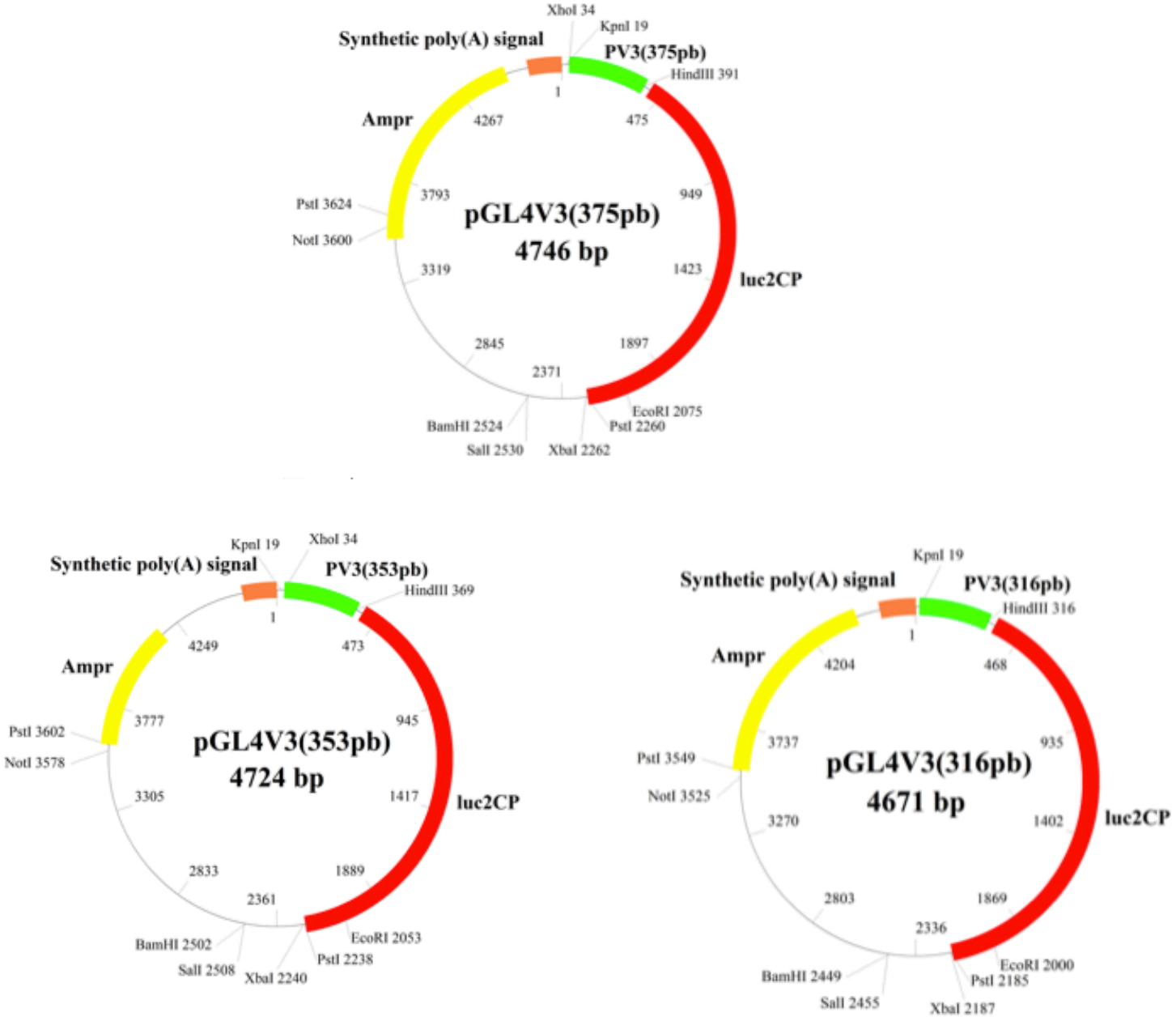


Figura 14: Se muestran las construcciones de los tres fragmentos del promotor V3 clonados en el vector pGL4.12.

Actividad de promotor de la isoforma V3 del *ST3GAL4*

Para la evaluación de actividad transcripcional de los fragmentos mas cortos del promotor V3, se empleó la construcción pV3 (1735 pb) del promotor completo, con la finalidad de normalizar los resultados. Tambien se usó la construcción pV3 ST3GAL4 (484 pb) previamente obtenida en el grupo de trabajo, la cual tenía una actividad similar al promotor completo y la construcción pV3 (209 pb) que carecía de actividad. En estas condiciones se comparó la actividad de promotor de las construcciones pV3 (375 pb), pV3 (353 pb) y pV3 (316 pb) (Figura 15).

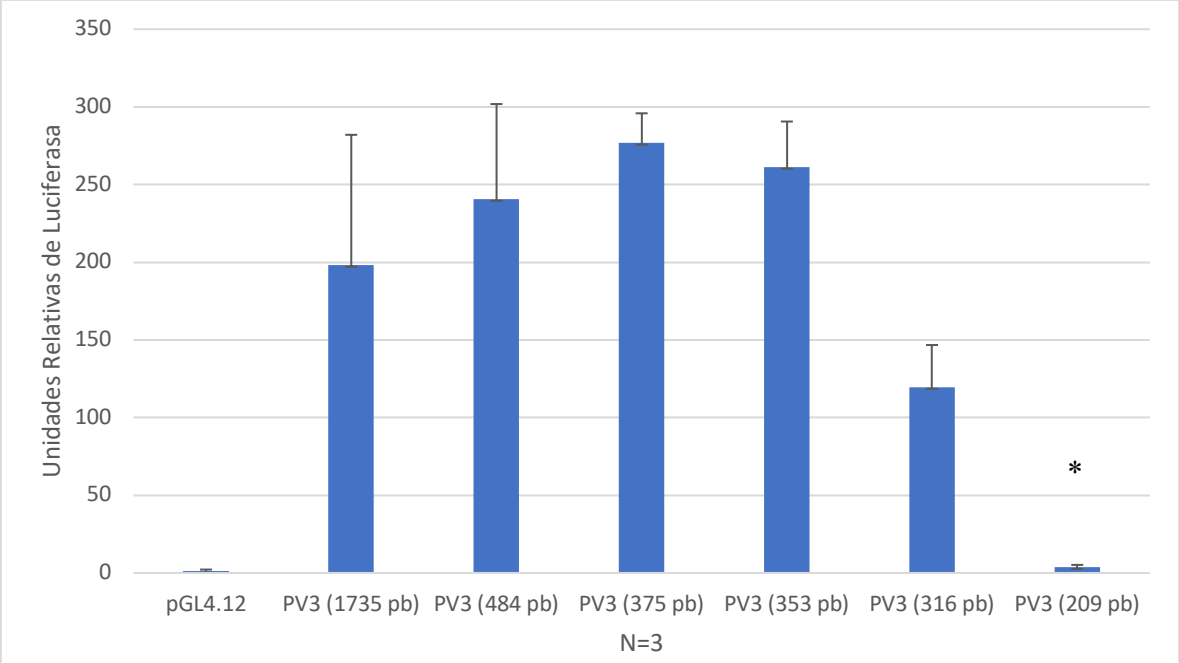


Figura 15: Grafica donde se muestran la actividad de promotor, siendo N el número de repeticiones y la que presentan asterisco las que presentaron una diferencia estadísticamente significativa, que se obtuvo por medio de una prueba T de Student.

Se observó que la actividad entre las construcciones pV3(1735 pb), pV3(482 pb), pV3(375 pb) y pV3(353 pb), no presentaron una diferencia significativa. Aunque se obtuvo un incremento del 39% en la actividad de promotor de pV3 (375 pb), con respecto al promotor completo y pV3 (353 pb) del 31%. Los resultados tambien mostraron que la construcción de pV3 (316 pb) tiene una disminución de actividad

del 40%. En cambio, en la contrucción pV3 (209 pb) se confirmo la falta de actividad de promotor.

DISCUSIÓN

El gen *ST3GAL4* el cual codifica para la enzima ST3GAL IV, es un gen multi-exogénico. Diversos estudios indican que codifica para seis isoformas, de las cuales, cuatro de ellas son las V, resultados de diversos promotores.

Hasta ahora, se ha estudiado los elementos que pueden regular la actividad del promotor V2, que da lugar a la isoforma de ARNm BX. Estudios a nivel molecular indican que en líneas celulares de cáncer de pulmón, la actividad de la señal de TNF (Tumor Necrosis Factor) puede incrementar la expresión de la isoforma BX (Colomb et al. 2012). Estudios mas finos, indican que la actividad de TNF está mediada por sitios AP2 el cual puede estar regulando la actividad de promotor (Colomb, 2016).

En el grupo de investigación se ha estudiado la actividad de promotor de la isoforma V2 del gen *ST3GAL4* en el que se encontraron sitios INR, los cuales son sitios de inicio de transcripcion, cajas GC, además también se encontró el factor SP1, el cual se sabe que participa en conjunto son los sitios INR para el reclutamiento de la maquinaria transcripcional (Monterrosas, 2018).

En el grupo de investigación se ha enfocado a estudiar el promotor de la isoforma V3. Así, el grupo de trabajo identificó y caracterizó el promotor de la isoforma V3 del gen *ST3GAL4*. Realizando deleciones a partir de la region 5´, se logró definir que un fragmento de 484 pb presenta una actividad similar a la del promotor completo, pV3(1735 pb) y que una región de 209 pb, no presenta actividad transcripcional de promotor.

En este trabajo se generaron tres fragmentos con deleciones en la región 5` de la construcción pV3 (484 pb), para evaluar la actividad de las construcciones pV3(375

pb), pV3 (353 pb) y pV3 (316 pb), con el fin identificar el promotor mínimo que se encuentra en la región comprendida entre las construcciones pV3 (484 pb) y pV3 (209 pb). La construcción pV3 (375 pb) se obtuvo un incremento en la actividad con respecto al promotor completo, lo cual puede deberse a que este fragmento carece de los sitios de unión VDR, Sp1, c-Myb, AP-1, ICP4, RAR-alpha, entre otros los cuales tienen la capacidad de promover el reclutamiento de la maquinaria transcripcional, a la vez que se encuentra el sitio AP-1 el cual también es un represor de actividad de promotor. Un ejemplo es el factor VDR, el cual se une al ADN para el reclutamiento de la maquinaria transcripcional (Fig.16), sin embargo se ha observado que VDR requiere de asociarse a otras proteínas para el reclutamiento de co-activadores, y por último el reclutamiento de la maquinaria transcripcional, por medio de lo que se conoce como transactivación (Carlberg y Campbell, 2013).

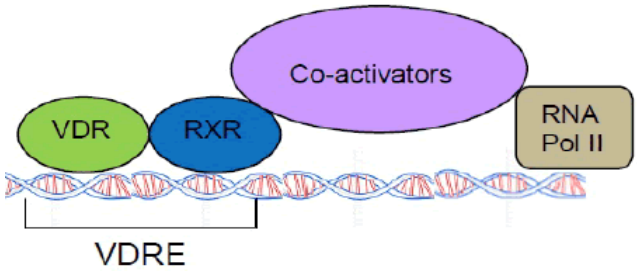


Figura 16: Reclutamiento de la maquinaria transcripcional en sitios VDR (Shakharkar et al. 2017).

Otro ejemplo es el sitio de reconocimiento a factor de transcripción SP1, es reconocido por la proteína SP1 la cual es un miembro de la familia SP, estos sitios se caracterizan por ser ricos en GC. SP1 es un activador transcripcional que se encuentra presente tanto en promotores con caja TATA como en los que carecen de caja TATA (Figura 17), al unirse SP1 al ADN puede transactivar la transcripción, interactuando de forma indirecta en el sitio TBP (sitio de unión de TFIID) para el reclutamiento de la RNA polimerasa en el caso de los promotores que cuentan con caja TATA, o bien empleando, co factores para el reclutamiento de TBP para despues reclutar la RNA polimerasa en el caso de los promotores carentes de caja TATA (Vizcaino et al. 2015).

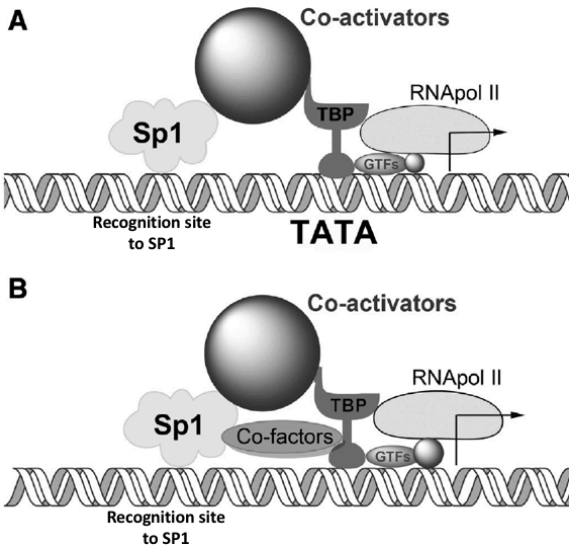


Figura 17: Reclutamiento de la maquinaria transcripcional en sitios SP1 (Vizcaíno et al. 2015).

Un último ejemplo es el sitio de reconocimiento AP-1, el cual es reconocido por miembros de la familia Fos y Jun (Fig.18), los cuales forman dímeros compuestos por un miembro de cada familia para el reconocimiento de sitio AP-1, seguido de la activación de transcripción con ayuda de CBP (CREB-Binding Protein) para el reclutamiento de la pol II (Karin et al. 1997)

Figura 18: Reconocimiento de sitio AP-1, el cual puede ser por heterodímero y homodímeros conformados por miembros de las familias Fos y Jun (Han et al. 2012)

En la construcción pV3 (353 pb), se observó una actividad similar a la construcción pV3 (375 pb), aun habiendo perdido TFIID, lo cual indica que no es un promotor regulado por TATA, y que requiere de otros elementos para el reclutamiento de la maquinaria transcripcional.

De forma relevante, se observó una disminución del 40% en la actividad de la construcción pV3 (316 pb), con respecto a la actividad del promotor completo pV3

(1735 pb). En este caso, el fragmento se caracteriza por la eliminación de los sitios de unión a SP1, CTCF, AML1, SP2, SP3 y SP4, y el mantenimiento del elemento DPE, ademas de ser la ultima construcción en mantener actividad de promotor, lo cual indica que los elementos que conserva son necesarios para el mantenimiento de actividad.

En la construcción pV3 (209 pb), no se encontró actividad de promotor, lo cual indica que uno de los elementos eliminados, son necesarios para la actividad de transcripcional del promotor V3. El elemento de promotor que fue eliminado de la construcción pV3 (209 pb) fue el sitio DPE que esta presente en pV3(316 pb), el cual trabaja en conjunto con los sitios INR para el reclutamiento de la maquinaria de transcripción (Figura 12).

Nuestros datos sugieren que SP1 es escencial para mantener la actividad de promotor de la variante V3 del gen *ST3GAL 4,* pues al removerlo en la contrucción pV3 (209 pb) se pierde actividad.

Se sabe que en promotores carentes de caja TATA, los sitios INR (Figura 19) funcionan como análogos a la caja TATA, ya que es capaz de dirigir la RNA polimerasa, estos elementos se encuentra tanto en promotores que cuentan con caja TATA como en los que carencen de ella, con una secuencia concenso (Butler y Kadonaga, 2002):

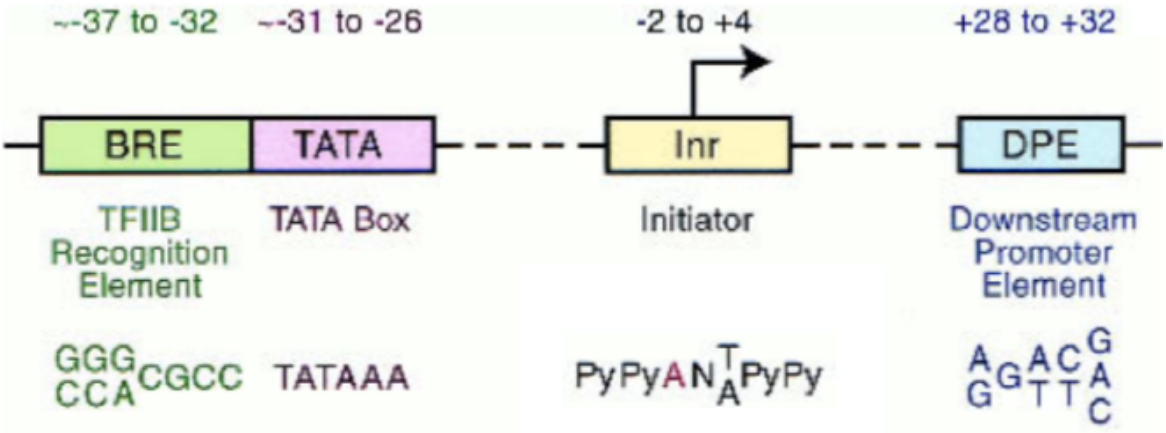


Figura 19: Estructura general de un promotor, en el que se muestran las ubicaciones y secuencias de los elementos de promotor, en el sitio INR “Py” es una pirimidina, “N” cualquier nucleótido y A de color rojo, el sitio donde inicia la transcripción (Butler y Kadonaga, 2002)

Actualmente se conocen cuatro elementos que se encuentran involucrados en la función de promotor, los cuales son: caja TATA, elementos de reconocimiento de TFIID, secuencias INR, y DPE (Kutach y Kadonaga, 2000). Se ha observado que en promotores carentes de caja TATA, los DPE funcionan de forma cooperativa con los sitios INR para el reclutamiento de la maquinaria de transcripción (Figura 20). Ya se han reportado promotores carentes de caja TATA en humano, uno de ellos es el promotor IRF-1, en el cual se ha observado que el sitio DPE trabaja en conjunto con INR, para el reclutamiento de la maquinaria transcripcional (Miyamoto et al. 1988; Kutach y Kadonaga, 2000).

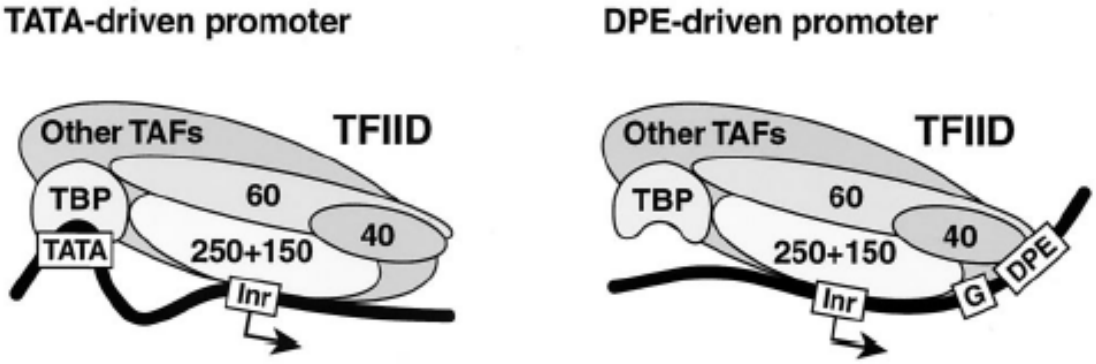


Figura 20: Comparación de promotores con caja TATA contra los carentes de caja TATA (Kutach y Kadonaga, 2000)

Los resultados del presente trabajo sugieren que el promotor mínimo del gen *ST3GAL4* corresponde al fragmento de 316 pb, ya que mantiene actividad de promotor y conserva los sitios necesarios para el reclutamiento de la maquinaria transcripcional. Este fragmento contiene elementos como SP1, CTCF, NF-1, c-Myb, AP-2, entre otros (Fig. 12), también contiene un sitios INR y DPE, los cuales son esenciales para mantener la actividad de promotor.

Conclusiones

El promotor de la variante V3 del gen ST3GAL4 es un promotor carente de caja TATA.

Se localizaron elementos de promotor como INR y sitios SP1 los cuales pueden mantener actividad de promotor.

El promotor mínimo se encuentra entre las posiciones -44 pb y -397 pb.

Perspectivas

Evaluar si el promotor V3 requiere de los sitios INR y sitios SP1 por medio de mutaciones puntuales.

Analizar las interacciones proteína-DNA de sitios de unión a factores de transcripción involucrados en el reclutamiento del complejo de iniciación la maquinaria transcripcional por medio de un ChIP.

Evaluar actividad del promotor V3 en otras líneas celulares de cáncer de cervicouterino.

Bibliografía:

- Bauer, J., y Osborn, H. M. (2015). Sialic acids in biological and therapeutic processes: opportunities and challenges. *Future Medicinal Chemistry*, *7*(16), 2285–2299.
- Bhide, G. P., y Colley, K. J. (2016). Sialylation of N-glycans: mechanism, cellular compartmentalization and function. *Histochemistry and Cell Biology*, *147*(2), 149–174.
- Blom, N., Sicheritz, T., Gupta, R., Gammeltoft, S., y Brunak, S. (2004). Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *PROTEOMICS*, *4*(6), 1633–1649.
- Burke, T. W., y Kadonaga, J. T.(1997). The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by $TAF_{II}60$ of *Drosophila*. *Genes & Development, 11*, 3020-3031.
- Butler, J. E., y Kadonaga J. T. (2002). The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression. *Genes & Development, 16*, 2583-2592.
- Carlberg, C., y Campbell, M. J. (2013). Vitamin D receptor signaling mechanisms: Integrated actions of a well-defined transcription factor. *Steroids*, *78*(2), 127–136.
- Cohen, E. N., Fouad, T. M., Lee, B., Arun, B. K., Liu, D., Tin, S.,…Reuben, J. M. (2019). Elevated serum levels of sialyl Lewis X (sLeX) and inflammatory mediators in patients with breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment, 176*(3), 545-556.
- Colomb, F., Krzewinski Recchi, M., El Machhour, F., Mensier, E., Jaillard, S., Steenackers, A.,…Groux Degroote, S. (2012). TNF regulates sialyl-Lewisx and 6-sulfo-sialyl-Lewisx expression in human lung through up-regulation of ST3GAL4 transcript isoform BX. *Biochimie*, *94*(9), 2045–2053.
- Colomb, F., Krzewinski Recchi, M., Steenackers, A., Vincent, A., Harduin Lepers, A., Delannoy, P., y Groux-Degroote, S. (2016). TNF up-regulates

ST3GAL4 and sialyl-Lewisx expression in lung epithelial cells through an intronic ATF2-responsive element. *Biochemical Journal*, *474*(1), 65–78.

- Colomb, F., Vidal, O., Bobowski, M., Krzewinski Recchi, M., Harduin Lepers, A., Mensier, E.,…Groux Degroote, S. (2014). TNF induces the expression of the sialyltransferase ST3Gal IV in human bronchial mucosa via MSK1/2 protein kinases and increases FliD/sialyl-Lewisx-mediated adhesion ofPseudomonas aeruginosa. *Biochemical Journal*, *457*(1), 79–87.
- Freeze, H. H., y Aebi, M. (2005). Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology*, *15*(5), 490–498.
- Han B., Rorke E. A., Adhikary G., Chew Y. C., Xu W., y Eckert, R. L. (2012) Suppression of AP1 Transcription Factor Function in Keratinocyte Suppresses Differentiation. *PLoS ONE 7*(5), 36941- 36941.
- Harduin Lepers, A., Vallejo Ruiz, V., Krzewinski Recchi, M. A., Samyn Petit, B., Julien, S., y Delannoy, P. (2001). The human sialyltransferase family. *Biochimie*, *83*(8), 727–737.
- Harrison, M. M., y Eisen, M. B. (2015). Transcriptional Activation of the Zygotic Genome in Drosophila. *Current Topics in Developmental Biology*, *113*, 85–112.
- Higel, F., Seidl, A., Sörgel, F., y Friess, W. (2016). N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *100*, 94–100.
- Julenius, K., Molgaard, A., Gupta, R., y Brunak, S. (2004). Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology*, *15*(2), 153–164.
- Kutach, A. K., y Kadonaga, J. T. (2000). The Downstream Promoter Element DPE Appears To Be as Widely Used as the TATA Box in *Drosophila* Core Promoters. *Molecular and Cellular Biology, 20*(13), 4754-4764.
- Lewis, B. A., Sims, R. J., Lane, W. S., y Reinberg, D. (2005). Functional Characterization of Core Promoter Elements: DPE-Specific Transcription

Requires the Protein Kinase CK2 and the PC4 Coactivator. *Molecular Cell*, *18*(4), 471–481.

- Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y.,…Taniguchi, T. (1988). Regulated Expression of a Gene Encoding a Nuclear Factor, IRF-1, That Specifically Binds to IFN-13Gene Regulatory Elements. *Cell, 54*, 903-913.
- Monterrosas, J. R. (2018). *Evaluación de la actividad del promotor v2 del gen st3gal4 en queratinocitos humanos y el efecto de las oncoproteínas e5, e6 y e7 del vph16* (Tesis de Licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- Munkley, J., y Elliott, D. J. (2016). Hallmarks of glycosylation in cancer. *Oncotarget*, *7*(23), 35478–35489.
- Ortiz Mateos, C. A. (2017). *Identificación y caracterización del promotor de la variante V3 del gen ST3GAL4 y la evaluación del efecto de las oncoproteínas virales E6 y E7 del VPH16 sobre su actividad* (Tesis de licenciatura). Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
- Pérez Cerda, C., Girós, M. L., Serrano, M., Pérez Dueñas, B., Ecay, M. J., Medrano, C.,…Pérez González, B. (2015). Trastornos de la glicosilación. *AECOM, 11*, 13-27.
- Petrescu, S. (2012). *Glycosylation* (2012) Rijeka, Croatia: InTech.
- Petretti, T., Kemmer, W., Schulze, B. y Schlag, P. M. (2000). Altered mRNA expression of glycosyltransferases in human colorectal carcinomas and liver metastases. *Gut*, *46*(3), 359–366.
- Ress, D. K., y Linhardt, R. J. (2004). Sialic Acid Donors: Chemical Synthesis and Glycosylation. *Current Organic Synthesis*, *1*(1), 31–46.
- Roa de La Cruz L., Martínez Morales P., Morán Cruz I., Milflores Flores L., Rosas Murrieta, N., González-Ramírez, C.,… Vallejo Ruiz, V. (2018). Expression analysis of ST3GAL4 transcripts in cervical cancer cells. *Molecular Medicine Reports*. *18*, 617-621.

- Saito, S., Yamashita, S., Endoh, M., Yamato, T., Hoshi, S., Ohyama, C.,… Miyagi, T. (2002). Clinical significance of ST3Gal IV expression in human renal cell carcinoma. *Oncology Reports*, *9*, 1251-1255.
- Sakharkar, P., Deb, S., y Vu, D.(2017). Vitamin D Receptor (VDR) Gene Polymorphism: Implications on Non-Bone Diseases. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy, 8*, 6-10.
- Steen, P. V., Rudd, P. M., Dwek, R. A., y Opdenakker, G. (1998). Concepts and Principles of O-Linked Glycosylation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *33*(3), 151–208.
- Taniguchi, A., Hioki, M., y Matsumoto, K. (2003). Transcriptional regulation of human Galβ1,3GalNAc/Galβ1, 4GlcNAc α2,3-sialyltransferase (hST3Gal IV) gene in testis and ovary cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *301*(3), 764–768.
- Taniguchi, A. (2008). Promoter Structure and Transcriptional Regulation of Human-Galactoside 2, 3-Sialyltransferase Genes. *Current Drug Targets, 9*, 310-316.
- Teintenier Lelièvre, M., Julien, S., Juliant, S., Guerardel, Y., Duonor Cérutti, M., Delannoy, P., y Harduin-Lepers, A. (2005). Molecular cloning and expression of a human hST8Sia VI (α2,8-sialyltransferase) responsible for the synthesis of the diSia motif on O-glycosylproteins. *Biochemical Journal*, *392*(3), 665–674.
- Vajaria, B. N., Patel, K. R., Begum, R., y Patel, P. S. (2015). Sialylation: an Avenue to Target Cancer Cells. *Pathology & Oncology Research*, *22*(3), 443–447.
- Vizcaíno, C., Mansilla, S., y Portugal, J. (2015). Sp1 transcription factor: A long-standing target in cancer chemotherapy. *Pharmacology & Therapeutics*, *152*, 111–124.
- Wang, B., y Brand Miller, J. (2003). The role and potential of sialic acid in human nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition*, *57*(11), 1351–1369.

- Wang, L., Liu, Y., Wu, L., y Sun, X. (2016). Sialyltransferase inhibition and recent advances. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, *1864*(1), 143–153.
- Wang, P., Feng Li, Y., Juang, C., Lee, Y., Chao, H., Tsai, Y., y Yuan, C. (2001). Altered mRNA Expression of Sialyltransferase in Squamous Cell Carcinomas of the Cervix. *Gynecologic Oncology*, *83*(1), 121–127.
- Werner, R. G., Kopp, K., y Schlueter, M. (2007). Glycosylation of therapeutic proteins in different production systems. *Acta Paediatrica*, *96*, 17–22.
- Wu, X., Zhao, J., Ruan, Y., Sun, L., Xu, C., y Jiang, H. (2018). Sialyltransferase ST3GAL1 promotes cell migration, invasion, and TGF-β1-induced EMT and confers paclitaxel resistance in ovarian cancer. *Cell Death & Disease*, *9*(11), 1-14.

ANEXOS

Anexo 1:

Elemento de unión	Secuencias	No. Repeticiones
alpha-CBF	CCAAT	1
AML1	TGTGGG	2
AML1a	TGTGGG	2
AML1c	TGTGGG	2
AP-1	CCAAG	1
AP-2	GGCCA, TGGCC	2
AP-2alphaA	GGCCA, TGGCC, GGGAAGA	3
AP-2alphaB	GGCCA, TGGCC, GGGAAGA	3
c-Ets-2	GGGAAG	1
c-Fos	CGTCA	3
c-Jun	CGTCA	3
c-Myb	GGTGAG, GAACTT	4
CACCC-binding factor	CACCC, GATTGG	2
CAR	TGAAC	1
CCAAT-binding factor	CCAAG	1
CBAF	ATTGG	2
CBF-B	ATTGG	1
CBTF	ATTGG	1
CDP2	CCAAT	2
Clox	CCAAT	2
CP1	GATTGG, ATTGG, CCAAT, GACAAG	11
CP2	CCAAT	1
CP1A	ATTGG	1
CRE-BP1	CGTCA	3
CREB	TGACG, CGTCA	6
CTCF	GCTGC, GATTGG	5
CTF	ATTGG	2
Cut11	CCAAT	2
CUTL1	CCAAT	2
E2F	GCGCTAA, TTTGGCG	3
ER-alpha	GGGCA	1
FOXO3a	CAAAACA	1

FXR	GGGTGA	1
gammaCAAT	CCAAT	1
gammaCAC1	CACCC	1
gammaCAC2	CACCC	1
GATA-1	GACAAG	1
GR	GGAATTT, AAAACA	2
GR-alpha	GGAATTT	1
GR-beta	GGAATTT	1
H1TF1	CCAATCA, GATTGG	2
H1TF2	CCAAT	1
HiNF-B	CCAATCA, GATTGG	2
HMG I	CAAAACA	1
HMG Y	CAAAACA	1
HNF-3alpha	TGTTT, CAAAACA	1
HNF-1	GGTTAG	1
HNF-1A	GGTTAG	1
HNF-1B	GGTTAG	1
HNF-1C	GGTTAG	1
HNF-3B	TGTTT, CAAAACA	2
HNF-3beta	CAAAACA	1
Hp55	TCACCT	1
Hp65	TCACCT	1
ISGF-3	GGAAA	2
NF-1	CTTTCC, GGCCA, TGGCC, ATTGG	4
NF-E	CCAAT	1
NF-E3	CCAAT	1
NFE-6	GACAAG	2
p58	TCACCT	1
RAR-alpha1	TGAAC, TCACCT, AGGTGA	6
RAR-beta	TGAAC, AGGTGA	2
RAR-gamma	AGGTGA	2
RXR-alpha	TGCCCT, GGGTGA, TGAAC, AGGTGA	5
RXR-beta	TCACCT, AGGTGA	2
Sp1	GGGCA, CCCCC, GGGGCC, CACCC, ACGCCC, CGCCC	7
Sp2	CCCCC	1
Sp3	CCCCC	1
Sp4	CCCCC	1
SRF	CCAAT	1
T3R-alpha	TCACCT	1

T3R-beta1	TCACCT	1
T3R-beta2	TCACCT	1
TCF-4E	CTTTGCT	1
TR2-11	AGGGCA	1
T3R-alpha	AGGTGA	1
TFIID	ATAAA	1
TBP	ATAAA	1
VDR	TGCCCT, GGGTGA, CGCCCT, TCACCT	5

Anexo 2:

Siglas	Significado
AML-1	Acute Myeloid Leukemia 1
AP-1	Activator Protein 1
c-Ets	E26 transformation specific
c-Myb	Myeloblastosis
CBP	CREB-Binding Protein
CP1	Ceft Palate 1
CTCF	CCCTC-binding factor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPE	Downstream promoter element
GD3	Disialodihexosylganglioside
GM3	Monosialodihexosylganglioside
EPD	Eukaryotic Promoter Database
Fuc	Fucosa
FXR	Farnesoid X Receptor
Gal	Galactosa
GalNac	N-acetilgalactosamina
Glc	Glucosa
GlcNac	N-acetilglucosamina
GR	Receptor de Glucocorticoides
INR	Initiator element
ICP4	Infected cell Polypeptide 4

ISGF	Interferon stimulated gene factor
LAR II	Luciferase Assay Reagent II
Man	Manosa
N	Asparagina
NF-1	Nuclear Factor 1
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBL	Passive Lysis Buffer
PBS	Phosphate Buffered Saline
RAR-alpha	Retinoic acid receptor alpha
S	Serina
SFB	Suero Fetal Bovino
Sia	Ácido siálico
sLe (x)	Siail Lewis X
SP1	Specificity Protein 1
SP2	Specificity Protein 2
SP3	Specificity Protein 3
SP4	Specificity Protein 4
ST3GAL IV	β-galactósido α-2,3-sialiltransferasa 4
T	Treonina
TCF	T Cell Factor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor Alpha
TRANSFAC	Transcription Factor
UFC	Unidades formadoras de colonia
UVP	Ultra violet products
VDR	Vitamin D Receptor