



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS



**“Efecto de HOTAIR sobre TET1 y la vía WNT en
la línea celular HeLa”**

T E S I S

Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biomédicas

P R E S E N T A

M. en C. Eric Genaro Salmerón Bárcenas

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. en C. Berenice Illades Aguiar

CODIRECTO DE TESIS:

Dr. en C. Daniel Hernández Sotelo

ASESOR EXTERNO:

Dr. en C. Alfredo Hidalgo Miranda



Instituto Nacional de
Medicina Genómica
MÉXICO

CHILPANCINGO GRO., ENERO DEL 2020.

Colaboraciones del proyecto

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Unidad Académica de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero en Chilpancingo Guerrero.

Bajo la dirección de:

Dra. Berenice Illades Aguiar

Codirección de:

Dr. Daniel Hernández Sotelo

Asesor externo:

Dr. Alfredo Hidalgo Miranda

Y bajo la asesoría de:

Dr. Eduardo Castañeda Sucedo

Dra. Gloria Fernández Tilapa

Durante el periodo en que curso el Doctorado en Ciencias Biomédicas, el M. en C. Eric Genaro Salmerón Bárcenas, recibió beca CONACYT (Febrero 2016-Enero 2019).

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Berenice Illades Aguiar.

Por confiar en mí y permitirme formar parte de su grupo de trabajo.

Al Dr. Daniel Hernández Sotelo.

Por compartir su tiempo y sus conocimientos conmigo a lo largo de 5 años.

A los integrantes de mi comité tutorial, **Dr. Eduardo Castañeda Saucedo, Dra. Gloria Fernández Tilapa y Dr. Alfredo Hidalgo Miranda.**

Por sus aportaciones para mejorar la tesis.

DEDICATORIAS

A mi familia:

A mi esposa Zuleyma Flores Rogel e hija Génesis Salmerón Flores, por ser el motor que me impulsa día a día para seguir adelante y por todo su apoyo.

A mis padres:

Genaro Salmerón Beltrán y Cristina Bárcenas Chacón, por apoyarme desde siempre y ser mi ejemplo a seguir.

A mis hermanos:

Paúl, Maricruz, Francisco y Estefanny, por apoyarme y estar conmigo siempre.

A don Jesús y doña Lina:

Por ser más que amigos, familia.

A don Silvino y doña Eva:

Por apoyarme siempre.

A mis amigos:

Laboratorio de Biomedicina Molecular: Israel, Hugo, Josué, Ramón, Luis, Maestro Julio, Ana Elvira, y demás.

Laboratorio de Epigenética: Lalo, Olga, Yunue, Sherlin y Jaqui.

Laboratorio de Biología Celular: Juan Carlos.

“Efecto de HOTAIR sobre TET1 y la vía WNT en la línea celular HeLa”

ÍNDICE

Contenido

1. Resumen.....	6
2. Introducción.....	7
3. Capítulo 1.....	14
4. Discusión.....	34
5. Referencias.....	36

“Efecto de HOTAIR sobre TET1 y la vía WNT en la línea celular HeLa”

1. Resumen

Introducción. HOTAIR es un RNA largo no codificante que favorece el desarrollo de cáncer, uno de los mecanismos involucra la sobre-activación de la vía WNT, la cual induce la expresión de genes involucrados en migración, proliferación e invasión celular. TET1 participa en la demetilación de DNA, recientemente se ha reportado que induce la expresión de reguladores negativos de la vía WNT. Hasta el momento se desconoce si HOTAIR regula la vía WNT a través de TET1, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la disminución de HOTAIR en la expresión de TET1 y en la actividad de la vía WNT. **Material y métodos.** La expresión de HOTAIR y TET1 se analizó mediante RT-qPCR en células HeLa. La disminución de la expresión de HOTAIR se realizó utilizando un DsiRNA en células HeLa. La vía WNT se evaluó mediante ensayos de luciferasa y western blot. La metilación en los promotores de genes se determinó mediante MSP. La hidroximetilación se determinó mediante modificación química seguida por qPCR. **Resultados.** La expresión de HOTAIR y TET1 es inversa en líneas celulares de cáncer cervical. La disminución de la expresión de HOTAIR incrementó la expresión de TET1 y disminuyó la metilación en su promotor en células HeLa. Además, la disminución de HOTAIR disminuyó la actividad de la vía WNT. Al explorar los mecanismos moleculares involucrados, se encontró que la metilación en los promotores de 4 genes reguladores negativos (PCDH10, SOX17, AJAP1 y MAGI2) de esta vía disminuyó e incrementó su expresión en condiciones de disminución de HOTAIR. Finalmente, el análisis de hidroximetilación reveló un incremento de esta en los promotores de estos 4 reguladores negativos de la vía WNT. **Conclusión.** HOTAIR promueve la sobre-activación de la vía WNT mediante la regulación negativa de PCH10, SOX17, AJAP1, MAGI2 y TET1 en células HeLa.

Palabras clave: HOTAIR, TET1, vía WNT, cáncer cervical.

“Efecto de HOTAIR sobre TET1 y la vía WNT en la línea celular HeLa”

2. Introducción

Hox transcript antisense intergenic RNA (HOTAIR) es un RNA no codificante largo (lncRNA) que se transcribe de la región 12q13.13, específicamente de la cadena antisentido en la región intergénica entre HOXC11 y HOXC12, y consta de 2,158 nucleótidos (Figura 1) (Rinn et al., 2007). La expresión de HOTAIR se limita a mamíferos, su secuencia es poco conservada y se ha sugerido que evolucionó más rápido que los genes de HoxC adyacentes (He et al., 2011).

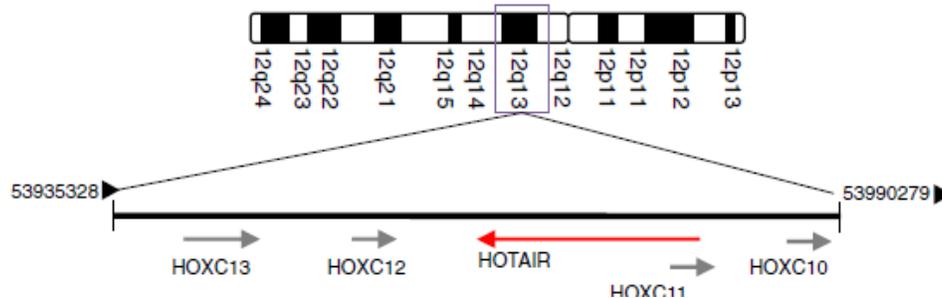


Figura 1. Localización genómica de HOTAIR. HOTAIR se transcribe a partir de una secuencia localizada en la región 12q13.13, en la cadena antisentido entre los genes HOXC11 y HOXC12 (flecha roja) (Bhan and Mandal, 2015).

HOTAIR actúa como una molécula “scaffold” para regular la expresión de sus genes blanco, en su extremo 5’ (89 nucleótidos) interacciona con el Complejo Represivo Polycomb 2 (PRC2), el cual tiene las subunidades EZH2, EED y SUZ12. EZH2 tiene un dominio SET, que cataliza la trimetilación de la histona H3 en la lisina 27 (H3K27met3), esta marca se asocia con represión transcripcional (Wu et al., 2013). Además, HOTAIR interacciona en su extremo 3’ (646 nucleótidos) con LSD1, que se encarga de la desmetilación de la lisina 4 en la histona H3 (H3K4) (Figura 2), una marca asociada con activación transcripcional (Tsai et al., 2010). La interacción de HOTAIR con el DNA ocurre en regiones ricas en GA, induciendo la formación de una triple hélice RNA:dsDNA, se ha sugerido que esta triple hélice funciona como anclaje para el reclutamiento de proteínas o indirectamente configura a la cromatina de tal forma que facilita su unión (Chu et al., 2011). Recientemente, se ha reportado que HOTAIR regula la expresión de genes actuando como RNA competidor endógeno (ceRNA) de microRNAs (miRNAs) a través de su interacción física con ellos, induciendo su degradación y desregulando la expresión de los genes blanco de miRNAs (Bhan and Mandal,

“Efecto de HOTAIR sobre TET1 y la vía WNT en la línea celular HeLa”

2015). Además, HOTAIR está involucrado en la regulación post-traducciona, ya que interacciona con la ubiquitin ligasa E3 (Mex3b y Dzip3) e induce la degradación proteosomal mediante ubiquitinación de ataxina-1 (involucrada en ataxia espinocerebral) y snurportina-1 (involucrada en transporte núcleo-citoplasmático) (Yoon et al., 2013).

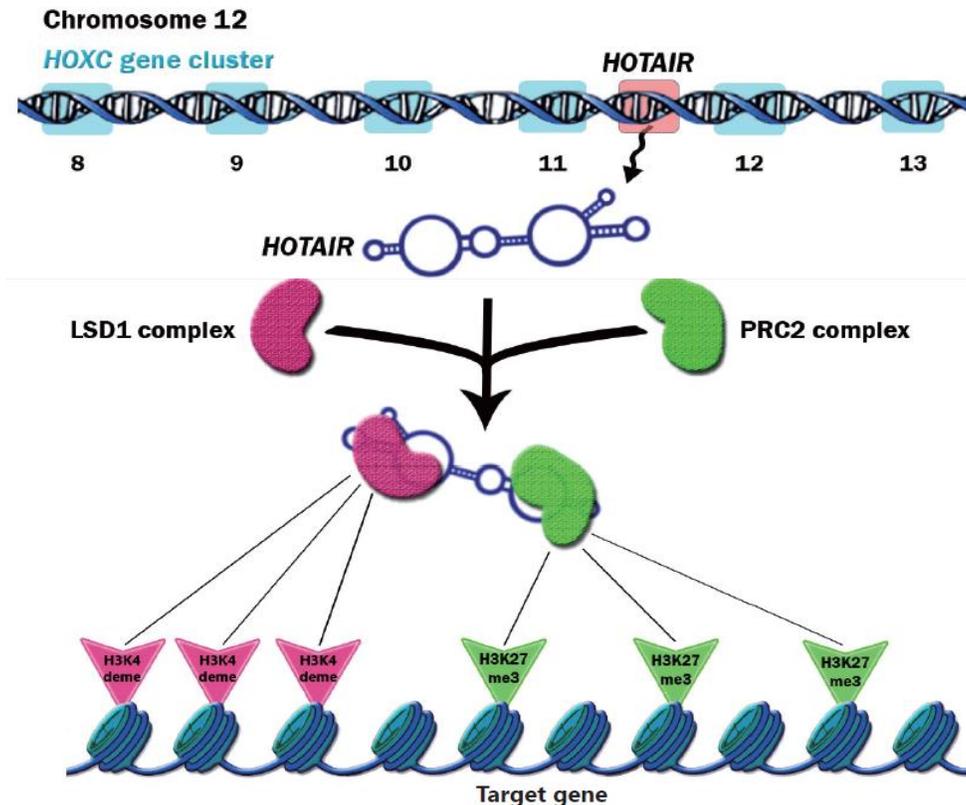


Figura 2. Regulación de genes blanco por HOTAIR. HOTAIR interacciona con los complejos represores LSD1 y PRC2 para desmetilar H3K4 y establecer la marca H3K27met3, ambas asociadas con represión transcripcional (Hajjari and Salavaty, 2015).

Inicialmente, se reportó que HOTAIR inhibía la expresión de genes homeóticos del locus HoxD involucrados en el desarrollo embrionario (Rinn et al., 2007), sin embargo, actualmente se sabe que HOTAIR juega un papel importante en cáncer (Hajjari et al., 2014). Se ha reportado que la expresión de HOTAIR está elevada en por lo menos 16 tipos diferentes de tumores humanos (Deng et al., 2014, Loewen et al., 2014). En cáncer, HOTAIR promueve la migración, invasión, proliferación celular, metástasis e inhibe la apoptosis al favorecer la expresión de

“Efecto de HOTAIR sobre TET1 y la vía WNT en la línea celular HeLa”

oncogenes y disminuir la expresión de genes supresores de tumor. Además, HOTAIR favorece la desregulación de múltiples vías de señalización celular, entre ellas la vía WNT (Tang and Hann, 2018). En este sentido, se ha reportado que HOTAIR promueve la sobre-activación de la vía WNT en cáncer de pulmón (Chen et al., 2015, Guo et al., 2018a), ovario (Li et al., 2015), esofaríngeo (Ge et al., 2013), colorectal (Xiao et al., 2018), gástrico (Cheng et al., 2018) y cervical (Guo et al., 2018b). Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos moleculares por los cuales HOTAIR estimula la vía de WNT, por lo que en este trabajo nos interesó estudiar este mecanismo.

El segundo objeto de interés en este trabajo fue TET1. Esta proteína consta de 2,136 aa, tiene un dominio CXXC en el extremo N-terminal (aa 500-910) y un dominio catalítico (CD) en el extremo C-terminal. El dominio CXXC reconoce y se une preferencialmente a CpGs no metilados, lo que favorece su unión a regiones ricas en CpGs en el genoma (Zhang et al., 2010). El CD es rico en Cys y cadenas β -hélice (DSBH) (Figura 3) (Tahiliani et al., 2009). Las regiones DSBH consisten de 8 cadenas β antiparalelas conservadas con motivos altamente conservados Hix-Xaa-Asp-(Xaa)n-His y residuos de Arg involucrados en la fijación de Fe(II) y α -cetoglutarato (α -KG) (Ko et al., 2015).

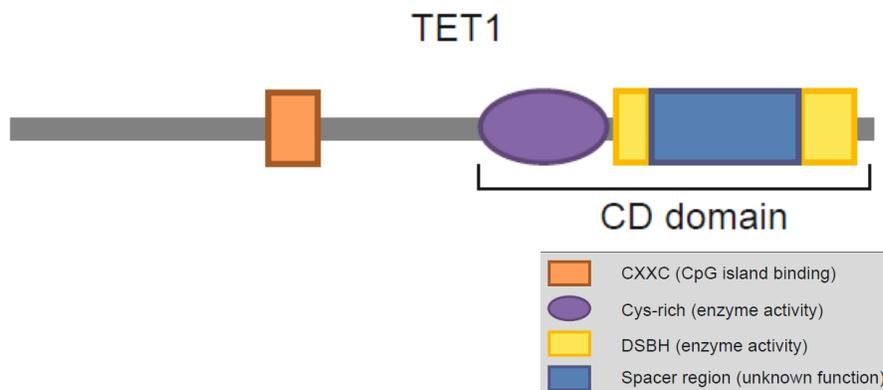


Figura 3. Estructura de TET1. Consta de un dominio CXXC (cuadro marrón), una región rica en Cys (óvalo morado) y una región DSBH (rectángulo azul) (Chen and Wu, 2016).

TET1 es una dioxigenasa dependiente de Fe(II) y α -KG que participa en la desmetilación activa del DNA mediante la oxidación de 5-metilcitocina (5mC) a 5-hidroximetilcitocina (5hmC), 5-formilcitocina (5fC) y 5-carboxilcitocina (5caC) a

“Efecto de HOTAIR sobre TET1 y la vía WNT en la línea celular HeLa”

través de su dominio CD en presencia de ATP (Figura 4) (Ito et al., 2011). El nivel global de 5hmC modifica la estructura de la cromatina y la actividad transcripcional local mediante el reclutamiento de proteínas de unión a 5hmC o excluyendo a proteínas de unión a CpGs metilados (MBPs). Por otra parte, TET1 participa en la desmetilación pasiva del DNA al excluir a metiltransferasas de mantenimiento 1 (DNMT1) debido a que no reconocen como sustrato a 5hmC (Tahiliani et al., 2009).

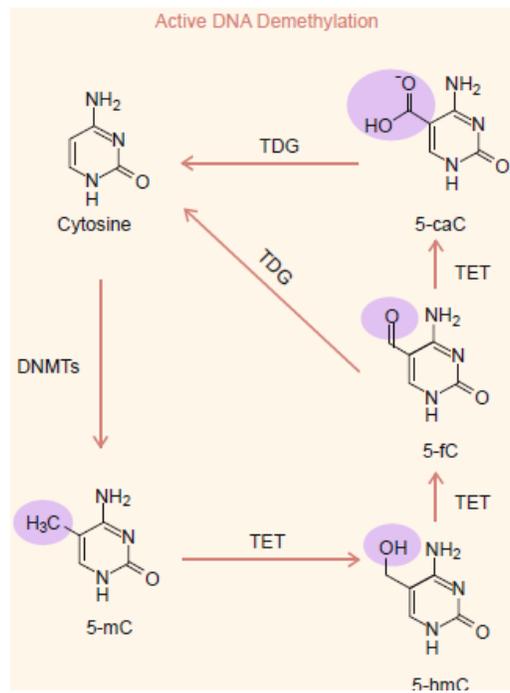


Figura 4. Papel de TET1 en la desmetilación activa del DNA. Las enzimas DNMTs catalizan la conversión de 5C a 5mC, después, las enzimas TETs catalizan la conversión de 5mC a 5hmC, 5fC y 5caC. El sistema de reparación del DNA por escisión bases (TDG) reconoce 5fC y 5caC y las sustituye por C no modificadas. Los grupos funcionales de las citocinas se muestran en color morado (Chen and Wu, 2016).

A nivel transcripcional, TET1 es regulada negativamente por metilación de su promotor y regulada positivamente por PPAR-1 (Ciccarone et al., 2014), HIF-2 α (Tsai et al., 2014), Oct4 y Sox2 (Koh et al., 2011); a nivel postranscripcional, TET1 es regulada negativamente por miembros de la familia miR-29 (miR-29a, miR-29b y miR-29c) (Morita et al., 2013, Ge et al., 2013), miR-22 (Song et al., 2013), miR-26a (Fu et al., 2013); y a nivel postraduccional, la glicosilación en Thr535, por N-

“Efecto de HOTAIR sobre TET1 y la vía WNT en la línea celular HeLa”

acetil-glucosamina (O-GINAc), aumenta la estabilidad de la proteína, por el contrario, la fosforilación de este residuo marca a la proteína para degradación vía proteosomal (Shi et al., 2013).

La disminución de TET1 es un evento que ocurre en múltiples enfermedades, entre ellas el cáncer (Tan and Shi, 2012). En cáncer, se han reportado niveles reducidos de esta proteína. Además, la re-expresión de TET1 en líneas celulares de cáncer humano disminuye la invasión, migración y proliferación celular (Rawluszko-Wieczorek et al., 2015). Recientemente se reportó que la re-expresión de TET1 inhibe la vía WNT en cáncer de colon (Neri et al., 2015a), ovario (Duan et al., 2017) y nasofaríngeo (Fan et al., 2018). Sin embargo, se desconoce gran parte de los mecanismos moleculares involucrados en dichos eventos.

La vía de WNT, participa en la regulación de la expresión de genes involucrados en la sobrevivencia, proliferación y diferenciación celular (Ochoa-Hernandez et al., 2012). La activación de este vía es regulada mediante la unión ligando-receptor. Los ligandos Wnt son glicoproteínas ricas en cisteínas de aproximadamente 350-400 aminoácidos que contienen un péptido señal N-terminal para su secreción. El primer ligando Wnt identificado fue Wnt3a, posteriormente se identificaron otros ligandos como Wls y Wg. Actualmente, se han identificado 19 ligandos Wnt en mamíferos (MacDonald et al., 2009, Ying and Tao, 2009). Por otra parte, los receptores de ligandos Wnt son Frizzled (Fz o Fzd) y la proteína relacionada al receptor de lipoproteína transmembranal (LPR). En mamíferos se han identificado 10 genes que codifican para receptores Fz. Además, hay dos tipos de co-receptores LPR: 5 y 6 (MacDonald et al., 2009).

La vía de WNT permanece inactiva en ausencia de ligando Wnt, en este estado el complejo APC/AXIN induce la fosforilación en la región N-terminal de β -catenina citosólica por CK1 α y GSK3 β , esto es reconocido por la ubiquitín ligasa E-3 β -TrpC que induce su ubiquitinación y degradación proteosomal (Figura 5A). Por el contrario, la vía de WNT se activa con la unión del ligando Wnt a su receptor Fzd y

“Efecto de HOTAIR sobre TET1 y la vía WNT en la línea celular HeLa”

su co-receptor LRP5/6, estos forman un complejo que recluta a Dvl, la cual fosforila LRP5/6. LRP5/6 fosforilado interactúa con AXIN, evitando que AXIN fosforile a β -catenina, esto ocasiona que β -catenina se acumule en citoplasma y se transloque al núcleo mediante la interacción directa con proteínas del poro nuclear. En el núcleo, β -catenina forma un complejo de activación transcripcional con factores de transcripción miembros de la familia TCF/LEF (TCF1, TCF3, TCF4 y LEF1) y activa la transcripción de sus genes blanco, como *c-Myc*, *CCND1*, *WISP1*, los cuales regulan la proliferación celular y la sobrevivencia (Figura 5B) (MacDonald et al., 2009, Ying and Tao, 2009).

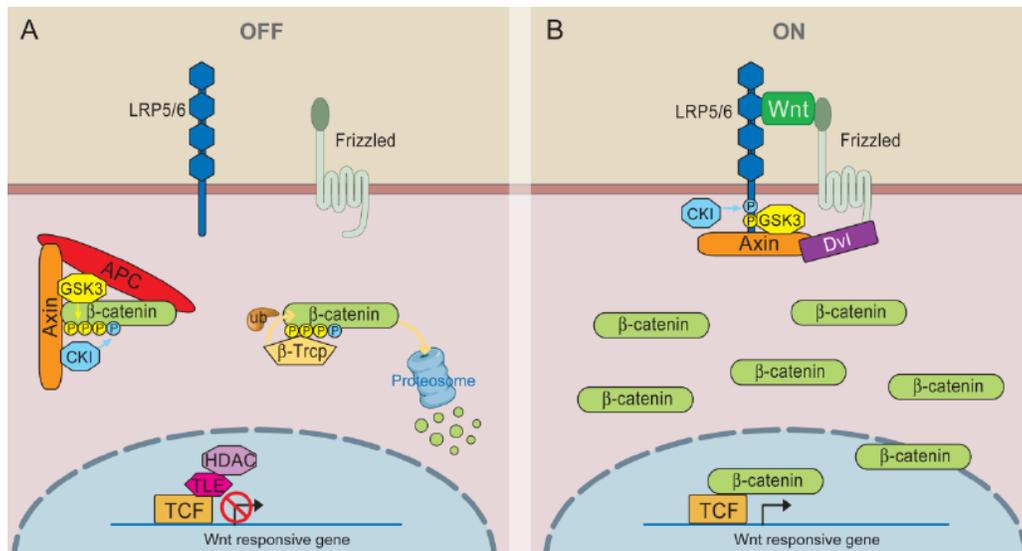


Figura 5. Regulación de la vía WNT. A) Vía de WNT en estado inactivo y B) Vía de WNT en estado activo (MacDonald et al., 2009).

La desregulación de la vía WNT es un evento común en múltiples enfermedades, entre ellas el cáncer. En cáncer se ha reportado que esta vía está sobre-activada, en parte, por la inhibición de sus reguladores negativos principalmente por hipermetilación de sus promotores o modificaciones de histonas (Figura 6) (Ochoa-Hernandez et al., 2012). Por ejemplo, se ha reportado que la hipermetilación en promotores de reguladores negativos de esta vía disminuye su expresión en carcinoma de células escamosas (SFRP-2, WIF-1, DKK-1, DACH-1 y

“Efecto de HOTAIR sobre TET1 y la vía WNT en la línea celular HeLa”

RUNX3) (Shiah et al., 2016) y cáncer cervical (DKK3 y SFRP2) (van der Meide et al., 2011).

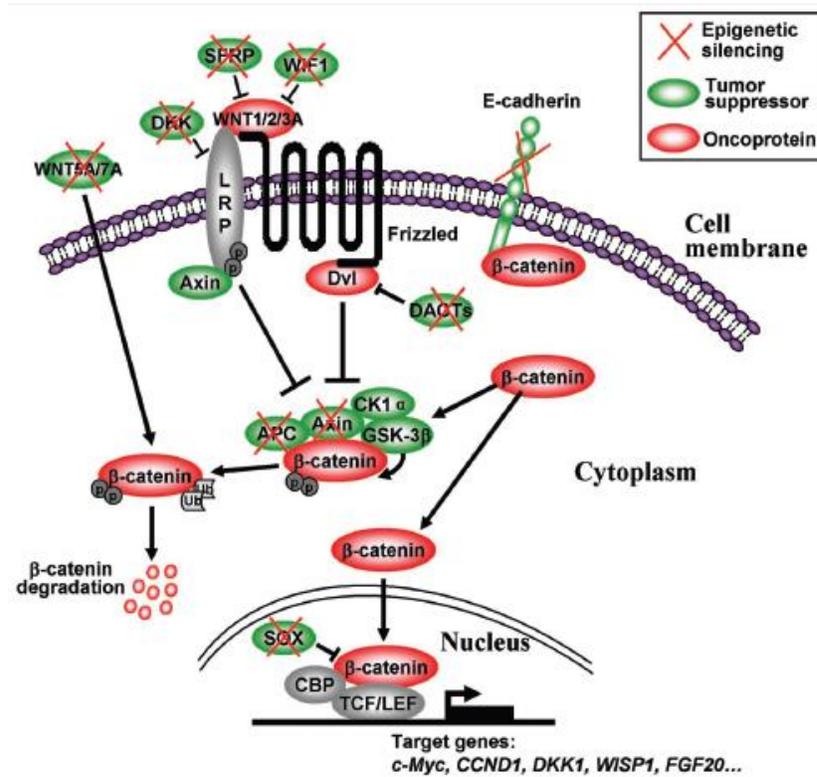


Figura6. El silenciamiento epigenético de reguladores negativos de la vía WNT inducen su activación en varios tipos de cáncer humanos. En cáncer, los reguladores negativos de la vía WNT (supresores de tumor) (óvalos verdes) son inhibidos epigenéticamente, favoreciendo la sobre-activación de la vía WNT mediada por sus reguladores positivos (oncoproteínas) (óvalos rojos) (Ying and Tao, 2009).

La vía WNT es una vía de señalización sobre-activada en varios tipos de cáncer, entre ellos el cáncer cervical. Uno de los mecanismos involucrados en la sobre-activación de esta vía es la inhibición de sus reguladores negativos y la metilación anormal de sus promotores es uno de los mecanismos que participan en su inhibición. Sin embargo, se desconocen los mecanismos involucrados en la sobre-activación de la vía WNT en cáncer cervical. En este trabajo analizamos el papel de HOTAIR en la vía de WNT y algunos de sus reguladores negativos, además analizamos la contribución de TET1 en este proceso en células HeLa.

3. Capítulo 1

HOTAIR knockdown decreased the activity Wnt/ β -catenin signaling pathway and increased the mRNA levels of its negative regulators in HeLa cells

“Efecto de HOTAIR sobre TET1 y la vía WNT en la línea celular HeLa”

Correo de aceptación del artículo para publicación:

Cellular Physiology and Biochemistry

Dear Dr. Hernández Sotelo,

We are pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in Cellular Physiology and Biochemistry. Thank you for choosing Cellular Physiology & Biochemistry for publication of your great paper. With best regards,

Prof. Dr. Erich Gulbins
Marc Abels

Original Paper

HOTAIR Knockdown Decreased the Activity Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway and Increased the mRNA Levels of Its Negative Regulators in HeLa Cells

Eric Genaro Salmerón-Bárceñas^{a,b} Berenice Illades-Aguiar^b Oscar del Moral-Hernández^c Arturo Ortega-Soto^d Daniel Hernández-Sotelo^a

^aLaboratorio de Epigenética del Cáncer, Facultad de Ciencias Químico Biológicas/Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo de los Bravo, México, ^bLaboratorio de Biomedicina Molecular,

Facultad de Ciencias Químico Biológicas/Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo de los Bravo,

México, ^cLaboratorio de Virología del Cáncer, Facultad de Ciencias Químico Biológicas/

Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo de los Bravo, México, ^dDepartamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados/Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México

Key Words

Wnt/ β -catenin • HOTAIR • Methylation • TET1 and hydroxymethylation

Abstract

Background/Aims: HOTAIR is a long non-coding RNA that promotes the development of human cancer. TET1 enzyme is involved in DNA demethylation by oxidation of 5-methylcytosine and it is considered a tumor suppressor in some types of cancer. HOTAIR and TET1 are involved in modulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, but their role in cervical cancer remains to be elucidated. The aim of this work was to analyze the effect of HOTAIR in TET1 expression, Wnt/ β -catenin signaling, and expression, methylation and hydroxymethylation of some negative regulators of this pathway in HeLa cells. **Methods:** HOTAIR and TET expression were analyzed by RT-qPCR and western blot. The HOTAIR knockdown was done with DsiRNA and the activity of the Wnt/ β -catenin signaling pathway through luciferase assays and β -catenin nuclear translocation. The mRNA levels of SNAIL, EDN3, CYCD1, SPRY2 (targets of Wnt/ β -catenin pathway) PCDH10, SOX17, AJAP1, and MAGI2 (negative regulators of Wnt/ β -catenin pathway) were evaluated by RT-qPCR. The DNA methylation and hydroxymethylation of negative regulators of the Wnt/ β -catenin pathway were evaluated by methylation-specific PCR and chemical modification, followed by digestion and quantitative PCR. **Results:** HOTAIR knockdown in HeLa cells decreased the activity of Wnt/ β -catenin signaling pathway. It increased the mRNA levels of Wnt/ β -catenin negative regulators through a decrease in their promoter's methylation pattern. TET1 enzyme was also down-regulated in HOTAIR knockdown cells. **Conclusion:** Our study suggests a mechanism in which HOTAIR promotes the over-activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway by downregulation of PCDH10, SOX17, AJAP1 and MAGI2 and also TET.

Daniel Hernández-Sotelo Laboratorio de Epigenética del Cáncer, Facultad de Ciencias Químico Biológicas,

Universidad Autónoma de Guerrero, Avenida Lázaro Cárdenas S/N Cuidad Universitaria,
Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, 39070 (México)
Tel. 52 7474710901, Fax 52 7474710901, E-Mail dherandez@uagro.mx

© 2019 The Author(s). Published by
Cell Physiol Biochem Press GmbH & Co. KG