



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS EN LA  
REGULACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *P53*  
HUMANO**

**TESIS**

**Que para obtener el grado de**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**Presenta**

**Biol. Ernesto Soto Reyes Solís**

**Tutor: Dr. Félix Recillas Targa**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Este trabajo fue realizado en el Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Genética Molecular, laboratorio 122-Norte de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la tutoría del Dr. Félix Recillas Targa quien recibió apoyos de Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) (IN209403, y IN214407), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 58767 y 42653-Q), y la Fundación Miguel Alemán, AC.

Los estudios de doctorado del Biol. Ernesto Soto Reyes Solís fueron apoyados con una beca doctoral del CONACyT (181389), y el complemento de beca de la Dirección General de Estudios de Postgrado-UNAM (DGEP-UNAM).

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Félix Recillas Targa	Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez	CMN-SXXI, H de Pediatría, IMSS.
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Depto Biología Médica, H de Nutrición, Salvador Zubirán.

La Biol. Georgina Guerrero Avendaño brindó una excelente asesoría técnica durante el desarrollo de esta investigación.

La laboratorista Gianelli Cortés González brindó un excelente apoyo logístico para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Los experimentos de citometría de flujo y la secuenciación de ADN se llevaron a cabo con la colaboración de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular a cargo de la Dra. Laura Ongay.

Se agradece al Dr. Manel Esteller, por las facilidades para realizar la estancia de investigación en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) en Madrid, España. Esta estancia fue posible gracias al apoyo del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y la beca otorgada por el programa de Movilidad Estudiantil de la UNAM.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo  
Vocal Dr. Mario Enrique Zurita Ortega  
Vocal Dr. Héctor Mayani Viveros  
Vocal Dr. Emilio Rojas del Castillo  
Secretario Dr. Félix Recillas Targa

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Dr. Félix Recillas Targa**, mi más sincero y profundo agradecimiento a quien ha guiado y formado en mi carrera científica. Doc, gracias por abrirme las puertas de tu laboratorio, por tus ganas de enseñarme y por la enorme atención que pusiste en mí desde el primer momento, y en particular por tu gran paciencia conmigo. Gracias también por ser más que mi asesor, sino que también un excelente amigo. Nunca me cansaré de agradecerte todo lo que me has enseñado y de todo lo que has hecho por mí.

**A la Geito**, mi tercera madre, que siempre has estado para escucharme y aconsejarme tanto en lo laboral como en lo personal, has sido un gran ejemplo en mi vida... te voy a extrañar muchísimo.

**A mi comité tutorial, gracias Dr. Zentella, Dr. Coral y Dr. Recillas**, gran parte de este trabajo ha podido lograrse por sus grandes aportaciones y dedicación, ha sido un gran honor haber aprendido de primera mano de grandes científicos como ustedes.

**A mi jurado de tesis**, gracias por enriquecer mi trabajo con sus consejos y sugerencias.

**Al Instituto de Fisiología Celular y la UNAM**, que ha sido mi casa durante muchos años. Gracias por todo el apoyo y la formación recibida.

**A Sara Noguera, ¡¡Sarita!!** Por aguantarme todos estos años, por tener las respuestas a todas mis preguntas y por ser una gran amiga.

**A Juan Manuel Barbosa e Ivette Rosas**, literalmente por haberme rescatado en una infinidad de ocasiones, sin ustedes simplemente no existiría gran parte de mi trabajo.

**A mi familia.** Este trabajo no habría sido posible sin su total apoyo.

**A mi Papá**, has sido un apoyo, ejemplo en mi vida de inteligencia y fortaleza. Espero llegar a ser como tú.

**A mis Mamás**, Narda y Pochola siempre han sido un apoyo y unas excelentes consejeras, me han orientado por el rumbo correcto, gracias de todo corazón, ustedes son las forjadoras de mi presente y mi futuro.

Gracias a mis tíos Laura y Carlos; a Patty, a mis primos (Lau, Carlos y Rodri) y a mis hermanos que siempre han estado ahí.

Gracias al abuelito Jorge y a Mina por preocuparse por mí. A mis tíos Pajarito y Dominique por apoyarme tanto en la realización de mis sueños.

**A mis amigos**, que han permanecido cerca de mí cuando más se necesitan.

Gracias por atravesar conmigo por distintas situaciones, desde mis logros hasta en mis derrotas.

**A los que ya no están conmigo...** “GÜELO, siempre has sido y serás la imagen de la persona que quiero llegar a ser.

**A los “ancianos y eternamente jóvenes” del lab!** Gracias por contribuir, enseñarme, regañarme y formarme. Son un grupo inolvidable, mi segunda familia. Gracias Mayrita, Trucha Inti, Abraham, Héctor, Martincito, Estelita, Gianelli y Félix. Sé que siempre contaré con ustedes.... SON UNA FAMILIA INCREIBLE!!

**A las “jóvenes promesas” del lab...** A los Cristian (tocayos), que siempre han nutrido mi trabajo de excelentes discusiones, y propuestas. Edgar, que siempre ha sabido resolver las cosas con “sus interesantes preguntas”.

**A los “niños y neonatos”...** Andrea, Erandi, Ricardo, David, y a todos los nuevos del lab, les deseo lo mejor en sus posgrados, están en uno de los mejores laboratorios.

**A la Charis.** Caray, con esas carcajadas matutinas a quien no le dan ganas de seguir trabajando en el laboratorio, gracias por hacer todos los días tan divertidos.

**A los anexos,** Rosario y Rafa gracias por apoyarme tanto para el desarrollo de esta tesis, se les va a extrañar mucho.

**A mis mujeres...** María (Kikita BB) has sido el pilar de mi vida, gracias por recorrer este largo camino conmigo, por soportar viajes, malos humores y desveladas, y mi Liluca linda! que por tus besos matutinos se cuando comienza el día.

Resumen	1
Abstract	2
<b><u>INTRODUCCIÓN</u></b>	<b>3</b>
<b>1- Desarrollo del cáncer</b>	<b>3</b>
1.1- Definiciones generales.	3
1.2- La hipótesis de Knudson y el cáncer.	5
1.3- Los defectos genéticos asociados al cáncer.	8
<b>2- La estructuración de la cromatina, regulación epigenética y cáncer.</b>	<b>10</b>
2.1- La cromatina.	10
2.2- Modificaciones post-traduccionales de histonas.	12
2.2.1- Las desmetilasas de histonas.	14
2.2.2- Las variantes de histonas.	16
2.3- La familia de proteínas Polycomb y Trithorax.	17
2.4- La metilación del ADN y el cáncer.	22
2.5- Las metil-transferasas de ADN (Dnmts).	27
2.6- Las proteínas de unión al ADN metilado.	29
2.7- Las islas CpGs, sus funciones biológicas y su nueva clasificación.	30
<b>3- Los oncogenes y genes supresores de tumores</b>	<b>33</b>
3.1- Los oncogenes.	33
3.2- Los genes supresores de tumores.	34
<b>4- El gen supresor de tumores p53 humano</b>	<b>36</b>
4.1- Los promotores del gen supresor tumoral p53 humano.	37
4.2- La proteína p53 y su papel regulador en la homeostasis celular.	40
4.3- Las modificaciones covalentes en el péptido p53.	42
4.4- Las variantes proteicas de p53.	43
<b>5- Antecedentes particulares</b>	<b>46</b>
5.1- El factor nuclear CTCF.	46
5.2- La regulación epigenética del promotor del gen <i>Rb</i> por el factor nuclear CTCF.	48
Planteamiento del problema.	48
Hipótesis.	49
Objetivo general.	49
Objetivos particulares.	49
Sistema celular empleados en el estudio.	50
<b><u>RESULTADOS</u></b>	<b>51</b>
1- Caracterización de los niveles de expresión del gen p53 humano y la abundancia de la proteína en distintas líneas celulares tumorales.	51
2- Análisis del estado de metilación del ADN en el promotor del gen p53 humano en líneas celulares tumorales.	53
3- Estudio <i>in vivo</i> de las modificaciones post-traduccionales en	



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

las histonas asociadas al promotor <i>p53</i> humano en distintas líneas celulares.	55
3.1- Inmunoprecipitación de cromatina en las líneas celulares tumorales.	56
3.2- Evaluación del estado de estructuración de la cromatina en las distintas líneas celulares.	58
4- Unión del factor nuclear CTCF <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> en la región 5' del promotor del gen supresor de tumores <i>p53</i> humano.	61
4.1- La unión <i>in vitro</i> de CTCF.	61
5- Contribución funcional del factor nuclear CTCF sobre la actividad del promotor del gen <i>p53</i> humano.	66
6- Perturbación local de la estructura de la cromatina en células deficientes a CTCF.	70
7- Modelo de silenciamiento epigenético del promotor del gen <i>p53</i> humano en líneas celulares de gliomas.	73
7.1- Caracterización de líneas celulares provenientes de gliomas.	73
7.2- Caracterización de los componentes epigenéticos involucrados en el silenciamiento del promotor del gen <i>p53</i> humano en líneas celulares de gliomas.	74
7.3- CTCF y su papel epigenético en líneas celulares de gliomas	76
7.4- El papel del factor transcripcional YY1 en el silenciamiento epigenético del promotor del gen <i>p53</i> humano.	78
8- El factor nuclear CTCF y su papel en la organización de las marcas de histonas al interior del núcleo.	81
Discusión.	85
Conclusiones.	94
Perspectivas	98
<b><u>ANEXOS</u></b>	100
<b>Anexo 1-</b> Estancia de investigación en el laboratorio de epigenética del cáncer dirigido por el Dr. Manel Esteller en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) Madrid, España (Enero a Junio de 2007). Estudio de la metilación del ADN en promotores de microRNAs en distintos contextos celulares y sus implicaciones sobre sus genes blancos.	100
<b>Anexo 2-</b> Efecto de la metilación <i>in vitro</i> sobre los promotores de genes supresores de tumores Rb y <i>p53</i> .	117
<b>Anexo 3-</b> Presencia de la proteína HP1 en el promotor del gen <i>p53</i> humano en linfocitos de sangre periférica.	125
<b>Anexo 4-</b> Defectos estructurales del nucléolo causados por la ausencia del factor nuclear CTCF.	128
Material y métodos.	143
Protocolos ampliados.	149
Bibliografía.	173
Bibliografía electrónica.	188
Artículos publicados.	189



## RESUMEN

El silenciamiento epigenético de promotores de genes supresores de tumores mediado por el establecimiento de marcas epigenéticas represivas aberrantes, actualmente es considerado como un factor asociado al inicio y desarrollo de diversos tipos de cánceres. A pesar del gran número de estudios realizados a la fecha se desconocen los mecanismos involucrados en el silenciamiento epigenético de genes asociados al control del ciclo celular. En el presente trabajo demostramos la unión del factor nuclear CCCTC (CTCF), localizado en el costado 5' del promotor del gen *p53* humano. La presencia de dicho factor es crítica en el establecimiento de una cromatina abierta en el promotor del gen *p53* humano; su ausencia, se asocia con el reclutamiento anormal de marcas represivas de histonas como H3K9me3, H3K27me3 y H4K20me3. Estas marcas pueden propagarse hasta el promotor del gen *p53* humano, causando un silenciamiento epigenético de dicho elemento de control y por ende, la inactivación transcripcional del gen *p53* humano, donde la metilación del ADN no está involucrada. Este fenómeno se ha observado tanto de manera endógena como en un contexto celular deficiente en CTCF. Estos hallazgos representa la primera evidencia que sugiere que CTCF tiene la capacidad de proteger al promotor del gen *p53* humano, considerado como una isla CpG pobre, en contra de marcas represivas de histonas. Involucrando directamente al factor CTCF en el desarrollo de enfermedades como el cáncer.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **ABSTRACT**

Aberrant repressive histone marks surrounding the promoter region of several tumor suppressor genes has been associated to epigenetic silencing in different types of cancer. However, the mechanism responsible of the protection of tumor suppressor gene promoters from silencing has not been elucidated. In the present research investigation, we analyzed a particular types of CpG-island and determined the binding of the CCCTC-binding factor (CTCF), to the 5' non-coding region of the human *p53* gene promoter who has the ability to maintain the gene promoter in a local open chromatin configuration. The absence of CTCF correlate with the abnormal recruitment of repressive histone marks as H3K9me3, H3K27me3 and H4K20me3 to the human *p53* gene promoter, no DNA methylation was found at the core-promoter. This is the first evidence suggesting that CTCF protects the *p53* gene promoter, defined as a poor-CpG-island, against epigenetic silencing. We propose that CTCF miss-regulation may cause abnormal regulation of *p53* gene expression with direct consequence in cancer development.

# INTRODUCCIÓN

## 1.- DESARROLLO DEL CÁNCER.

Según la Organización Mundial de la Salud, se estima que en el mundo más de once millones de personas son diagnosticadas con cáncer cada año, y además se ha demostrado un incremento en el número de casos año tras año. El cáncer causa siete millones de muertes anualmente, siendo que el 12.5% de la población mundial fallece por esta causa ([www.who.int/es/](http://www.who.int/es/)).

### 1.1- Definiciones generales.

El cáncer es considerado como un conjunto de enfermedades caracterizadas por una proliferación celular descontrolada. Los orígenes de esta enfermedad son múltiples y variados, las cuales incluyen factores ambientales, agentes infecciosos, genéticos y epigenéticos (Balmain et al., 2003).

Existen seis fases del desarrollo del cáncer las cuales son: iniciación, promoción, transformación, progresión, formación del tumor y metástasis, las cuales describiremos con más detalle a continuación (Figura 1A). En la iniciación, se encuentran involucrado tanto factores ambientales, genéticos y más recientemente, epigenéticos los cuales promueven que una o varias células adquieran características que fomenten su división celular descontrolada (Sherr, 2004). Estos cambios ocurren a nivel molecular, causando la inactivación de genes supresores de tumores, los cuales tienen la función de regular el ciclo celular. A la par, se presenta una sobre-expresión de genes conocidos como



Universidad Nacional  
Autónoma de México



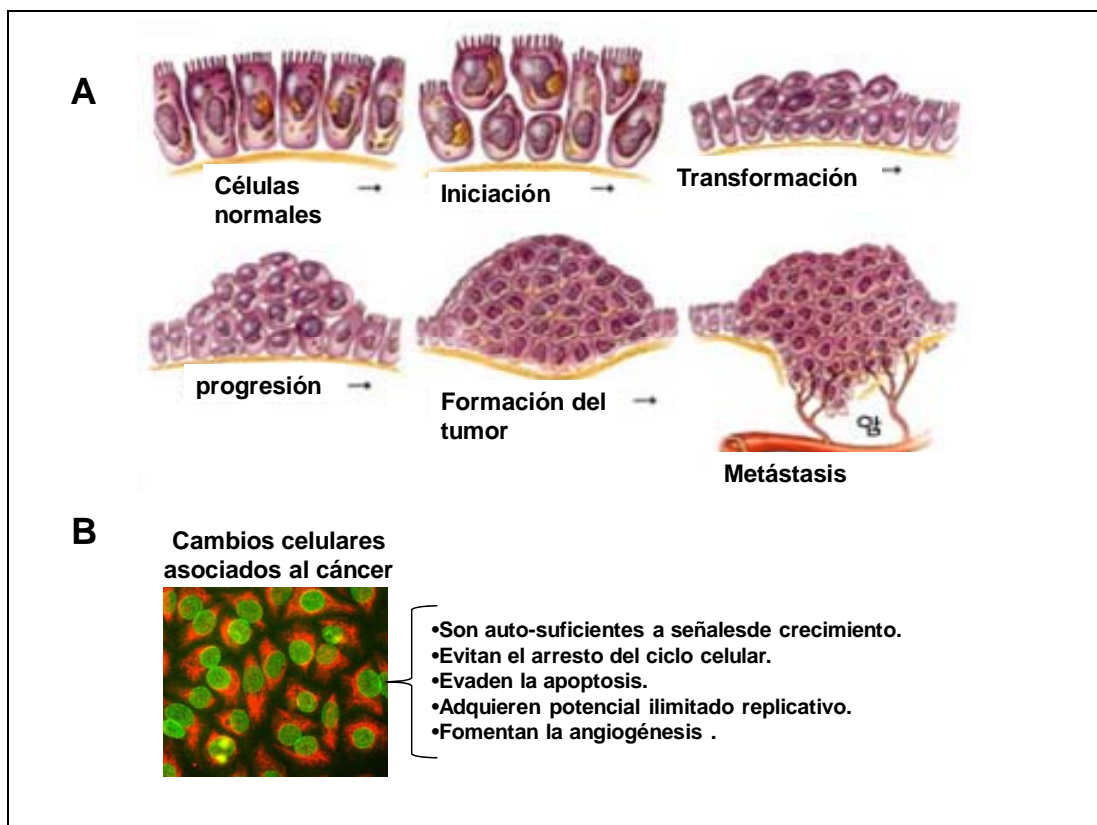
**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

oncogenes, que promueven la división celular (Sherr, 2004). Estos procesos fomentan la transformación celular, la cual se propaga de manera heredable, derivando en su promoción (Hanahan y Weinberg, 2000; Feinberg et al., 2006). La adquisición de todos estos cambios permite que las células puedan dividirse de manera descontrolada, fomentando el crecimiento de un tumor canceroso (Figura 1B). Por si fuera poco, muchas de estas células tumorales tienen la capacidad de adquirir ventajas adaptativas que les permiten migrar hacia otros tejidos blancos, fenómeno conocido como metástasis (Figura 1A).



**Figura 1.** Procesos celulares y moleculares asociados al cáncer. **A-** Representación esquemática de las distintas fases del desarrollo del cáncer, las cuales incluyen: iniciación, transformación, progresión formación del tumor y metástasis. **B-** Características adquiridas por las células cancerosas durante la fase de progresión celular.

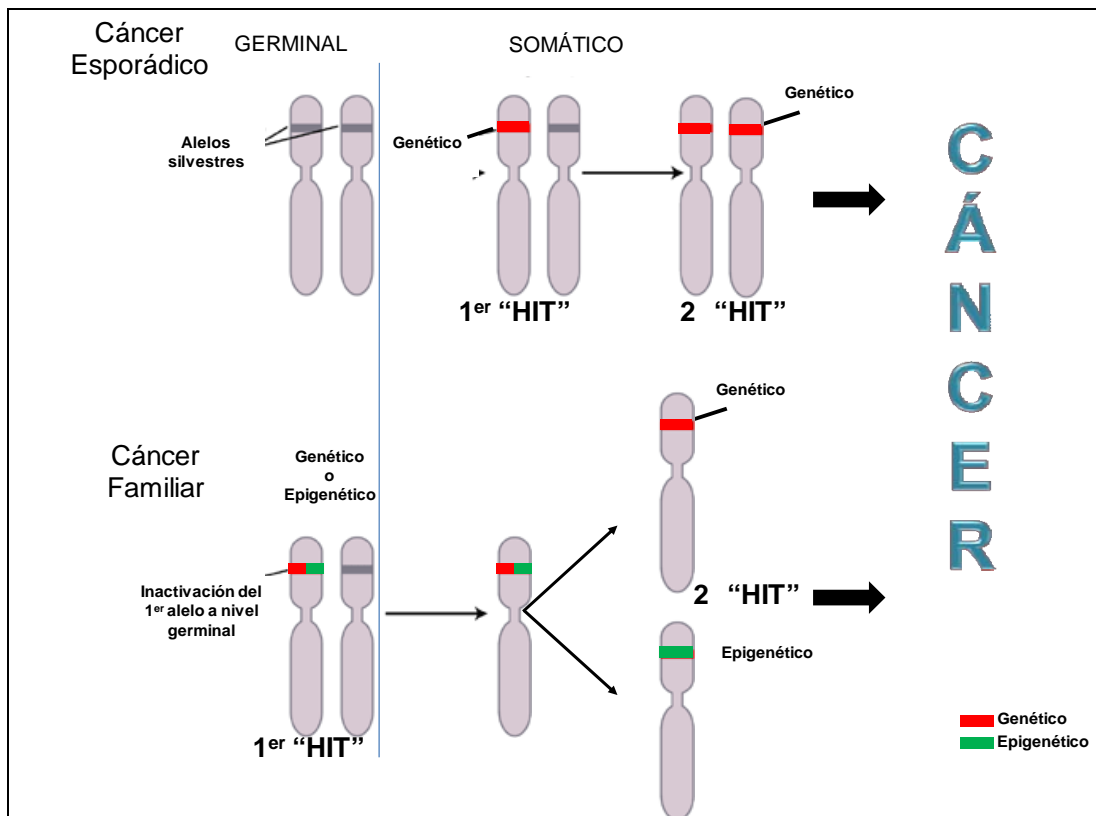
## 1.2- La hipótesis de Knudson y el cáncer.

Los estudios pioneros sobre el cáncer sugerían que al menos se necesitaban de 3 a 7 cambios genéticos para el desarrollo de un proceso canceroso (Ashley, 1969). Pero fue hasta 1971 cuando Alfred Knudson y colaboradores realizaron un estudio epidemiológico sistemático del desarrollo de un tipo de cáncer asociado a la formación de tumores pediátricos en la retina, conocido como retinoblastoma (Knudson, 1971). Especialmente se enfocaron en analizar aquellos casos donde se presentaba cáncer bilateral (en ambos ojos), lo cual sugería una mutación inherente a nivel germinal y por ende al desarrollo de un cáncer de tipo familiar. En contraste, los casos con cánceres primarios unilaterales sugerían no estar asociados a la herencia, considerados como cánceres de tipo esporádicos (Paige, 2003). Desde la perspectiva hereditaria (presente en tan solo de un 5 al 10% del total de casos), alteraciones de un alelo se hereda de uno de los padres a través de la línea germinal, mientras que la segunda alteración o segundo "hit", se adquiere a nivel somático (Figura 2). Desde la perspectiva clínica, los tumores primarios derivados por dicho fenómeno se presentan a edades tempranas (<50 años), de manera bilateral, y/o con presencia de más de un tipo de cáncer (Knudson, 1971; Sifri et al., 2004). Este estudio derivó en el postulado conocido como la hipótesis de los dos "hits" de Knudson la cual es aplicable a la mayoría de los genes supresores de tumores, incluido a *p53*. En la actualidad se conoce que la pérdida completa de la expresión de un gen

supresor de tumores puede conferir una ventaja de selección para el desarrollo del cáncer (Balmain, 2002); pero a su vez se ha observado que la inactivación de un solo alelo, puede ser susceptible de desencadenar un proceso tumorigénico, dicho fenómeno se le conoce como haploinsuficiencia (Figura 2; Quon y Berns 2001; Balmain 2002; Fodde y Smits 2002).

Por lo general se asume que la inactivación de ambos alelos era mediada únicamente por alteraciones genéticas como por ejemplo translocaciones, y la pérdida de fragmentos de cromosomas, amplificaciones, y principalmente mutaciones, entre otras. Actualmente, existen evidencias experimentales sólidas que demuestran que tanto eventos genéticos, como epigenéticos pueden estar involucrados en la inactivación de genes supresores de tumores (Jones y Laird, 1999; Balmain, et al., 2002; Laird, 2003 y 2005). Existen reportes en donde se observa la interdependencia de ambos fenómenos para la inactivación de genes. Dentro de los ejemplos se destaca la inactivación del gen hipermetilado en cáncer 1 (*HIC1*) y su directa relación con el gen *p53*; siendo que para el silenciamiento de *HIC1* mediado por procesos epigenéticos, es necesaria la mutación del gen *p53* para el desarrollo del cáncer de colon. Estos fenómenos sugieren una interdependencia de la inactivación de ambos genes por diferentes mecanismos (Chen et al., 2004; Fleuriel et al., 2009).





**Figura 2.** Esquema de los dos tipos de cánceres (Cáncer esporádico y familiar, en donde modelo clásico de dos "hits" de Knudson se engloba). En cáncer esporádico, ambos alelos sufren alteraciones (mayoritariamente genéticas) a nivel somático. Por otro lado en el cáncer familiar se presentan alteraciones en uno de los alelos en células germinales, mediado por factores genéticos o epigenéticos. Los individuos que acarrean uno de los alelos inactivados, tiene una mayor susceptibilidad al desarrollo de cáncer. Por un lado, esto puede provocar un fenómeno conocido como haploinsuficiencia, donde un alelo funcional es incapaz de llevar a cabo las funciones normales del gen. A la par, la inactivación de un segundo alelo puede ser mediada tanto por factores genéticos como epigenéticos fomentando el desarrollo de un proceso carcinogénico. La inactivación de ambos alelos puede llevarse a cabo tanto por procesos genéticos y/o epigenéticos, y pueden estar interconectados con la inactivación de otros genes.

Lo anterior sugiere que la inactivación de genes asociados al control de ciclo celular, como los genes supresores de tumores favorecen al desarrollo de procesos tumorales, donde dependiendo del estadio de inactivación de los alelos, puede asociarse a cáncer esporádico o cáncer familiar. Incluso la inactivación de uno solo de los alelos contribuye de manera importante a un proceso tumoral. Estos cambios moleculares permiten a las células tumorales obtener

características muy particulares que fomentan su proliferación celular, evasión a la reparación del ADN y la muerte celular o apoptosis, las cuales mencionaremos a continuación.

### **1.3- Los defectos genéticos asociados al cáncer.**

Dentro de las características que adquieren las células cancerosas se encuentran: ser auto-suficientes a señales de crecimiento, evitar el arresto del ciclo celular, evadir la muerte celular programada (apoptosis), adquirir un potencial ilimitado replicativo y fomentar la angiogénesis, todos estos fenómenos se engloban en la fase de la progresión celular del cáncer (Figura 1B). A nivel molecular y en particular epigenético se ha observado distintos fenómenos asociados al cáncer. Uno de los ejemplos clásicos es la pérdida de la impronta genómica (LOI), donde se da la activación de la expresión del alelo que normalmente se mantiene silenciado, causando una expresión bi-alelica, como en el caso del factor de crecimiento insulínico tipo II (*IGF2*) o el silenciamiento del alelo activo como en el caso de  $p57^{KIP2}$  (Feinberg et al., 2002). La región del control de la impronta (ICR), es la encargada de regular en parte la expresión mono-alelica de los genes improntados mediante la unión del factor nuclear CTCF (el cual abordaremos con mayor detalle más adelante). La metilación diferencial del ADN en el ICR evita la unión de dicho factor, lo cual constituye un “switch” binario de la expresión mono-alelica de los genes como en el caso de *IGF2/H19* (Edwards y Ferguson-Smith, 2007). El fenómeno de LOI se ha descrito

comúnmente en tumores sólidos de adultos como cáncer colorectal, hígado, leucemias y cáncer de pulmón (Cui et al., 2001; Cui, 2007).

Otro fenómeno que se puede observar en cáncer (desde una perspectiva genética) es la pérdida de la heterocigosidad, donde aberraciones cromosómicas son compensadas anormalmente mediante la duplicación del cromosoma remanente del par original. La duplicación crea dos copias del mismo alelo en el locus, con la pérdida de uno de los alelos parentales originales. A dicho proceso se le conoce como pérdida de la heterocigosidad (LOH). La LOH fomenta cambios genéticos y epigenéticos que conllevan al desarrollo de un proceso carcinogénico (Grady y Carethers, 2008).

Por otro lado la inestabilidad cromosómica (CIN) se presenta por defectos genéticos y/o epigenéticos que afectan la duplicación y segregación de cromosomas durante la mitosis. La CIN incrementa la probabilidad de rearrreglos genéticos derivando en el desarrollo de un proceso tumoral (Rajagopalan et al., 2003). Por esta razón, las células cancerosas no solo contienen un número aberrante de cromosomas (por lo general de 60 a 90) sino que también difieren en su contenido y distribución génica. Lo anterior puede asociarse a las deficiencias en los mecanismos de reparación del ADN, generalmente por la inactivación de los genes *hMLH1*, *hMSH2*, *ATM*, *BRCA1* y *BRCA2*, entre otros (Lynch y De La Chapelle, 2003; Rajagopalan y Lengauer, 2004). Como se puede observar, una visión más global y actual de los mecanismos asociados en la iniciación y/o progresión del cáncer ha integrado no solo a los procesos genéticos, sino también a los epigenéticos que pueden ser responsables de la inactivación de múltiples genes asociados a ciclo celular, y por ende al desarrollo de un proceso tumoral.

## **2.- LA ESTRUCTURACIÓN DE LA CROMATINA, REGULACIÓN EPIGENÉTICA Y CÁNCER.**

### **2.1- La cromatina.**

Desde hace mucho tiempo se conoce que los eucariontes tienen estructurado su genoma en cromatina, en donde la unidad fundamental de ésta es el nucleosoma. El nucleosoma está conformado por un octámero de histonas (compuesto por dos copias de cada histona H2A, H2B, H3 y H4), al cual se asocian 147 pares de bases (pb) de ADN abarcando 1.75 vueltas (Turner, 2007). Dicha conformación favorece, en asociación con otras proteínas, la compactación del genoma a múltiples niveles (Felsenfeld y Groudine, 2003). La estructura de 10 nm, también conocida como “collar de perlas”, es el nivel primario de compactación. A su vez, el collar de perlas tiene la capacidad de compactarse en niveles superiores de complejidad mediante varias proteínas, entre las cuales se encuentra la quinta histona conocida como histona H1, que es necesaria para alcanzar el siguiente nivel de compactación, conocido como la fibra de 30 nm ó solenoide (Figura 3; Felsenfeld y Groudine, 2003).



Universidad Nacional  
Autónoma de México

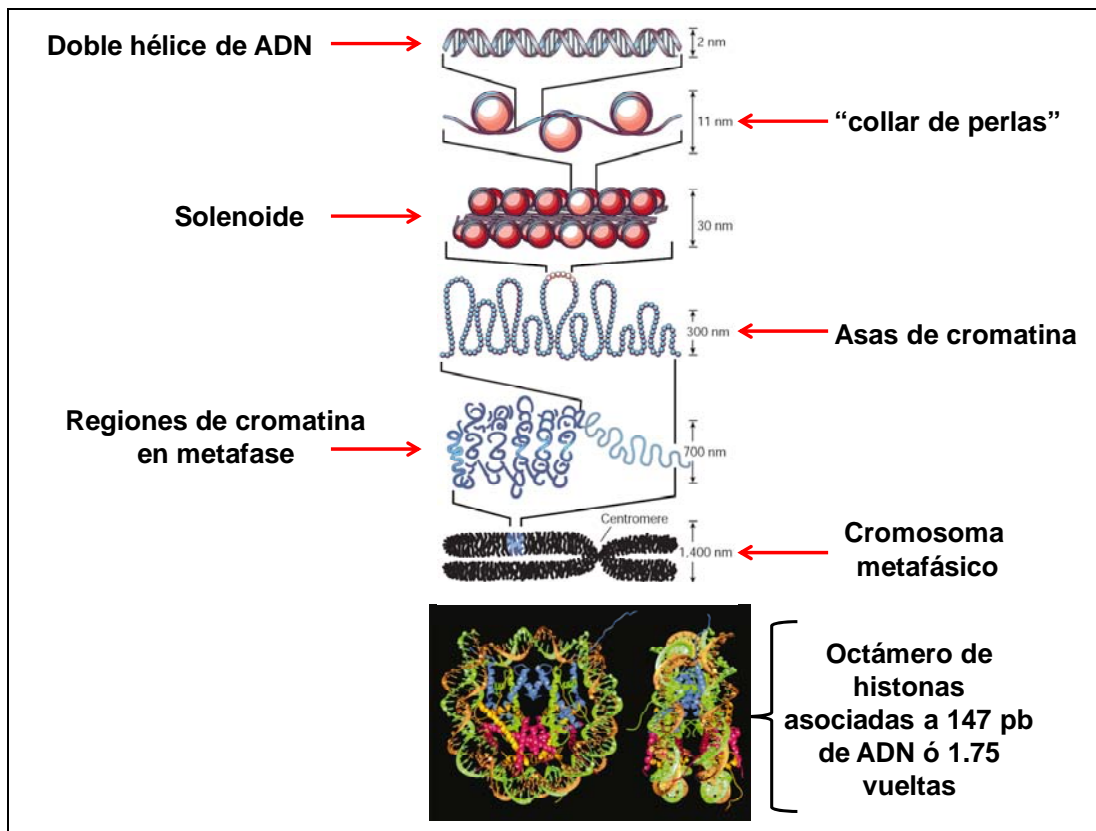


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**Figura 3.** Esquema donde se representan los distintos niveles de estructuración de la cromatina, desde su organización primaria, "el collar de perlas" hasta su forma más compacta, "el cromosoma metafásico". En la parte inferior se presenta un modelo del nucleosoma y el ADN a una resolución de 2.8 Å (tomado de Felsenfeld y Groudine, 2003).

El empaquetamiento del genoma en cromatina tiene repercusiones directas en la actividad transcripcional, siendo necesaria su remodelación para llevar a cabo la expresión de los genes en un espacio y tiempo definido. Los responsables de llevar a cabo el remodelaje de la cromatina contribuyen a la realización de diversos procesos epigenéticos, por lo cual la regulación epigenética se definen como todos aquellos cambios heredables en la expresión de los genes que ocurren sin que se presenten modificaciones en la secuencia del ADN (Recillas, 2002; Lund y van Lohuizen, 2004; Baylin, 2005). Dentro de los múltiples procesos epigenéticos está la metilación del ADN, la incorporación de variantes de

histonas, los complejos de remodelaje ATP-dependientes, como las proteínas del grupo SWI/SNF, las modificaciones post-traduccionales de histonas y los complejos represores Polycomb (PcG) y activadores Trithorax (Trx), siendo estas dos últimas en las que nos concentraremos más adelante (Wolffe, 1994).

## **2.2- Modificaciones post-traduccionales de histonas.**

Las regiones amino-terminales de las histonas que sobresalen de la estructura nucleosomal funcionan como registros y señales altamente específicas para la regulación transcripcional. Los nucleosomas y las histonas que los conforman son blancos de múltiples modificaciones epigenéticas que al ser reconocidas por diversos complejos proteicos, modulan tanto la apertura como la compactación de estructura de la cromatina. Las histonas sufren distintas modificaciones covalentes que incluyen a la acetilación de residuos de lisinas, la metilación de lisinas y argininas, la fosforilación de serinas y treoninas, la ADP-ribosilación de ácidos glutámicos y la ubiquitinación y sumoilación de residuos de lisinas (Shiio y Eisenman, 2003; Lund y van Lohuizen, 2004; Herrmann et al., 2005; Huang y Berger, 2008; Sims, 2008). Se ha sugerido que las múltiples modificaciones post-traduccionales de las histonas conforman en conjunto un “código de histonas”, el cual puede ser leído por proteínas vinculadas con la regulación del estado de compactación de la cromatina (Jenuwein y Allis, 2001). La combinatoria de modificaciones en las histonas sugiere una alta complejidad relacionada con diferentes procesos celulares como la reparación del ADN, duplicación, dinámica nuclear y diferenciación de células pluripotentes, y la

regulación de la expresión de genes en un tiempo y espacio específico, en donde su des-regulación está claramente ligada al desarrollo del cáncer (Jenuwein y Allis, 2001; Jones y Baylin, 2002; Santos-Rosa y Caldas, 2005; Feinberg et al., 2006; Lee et al., 2006; Duncan et al., 2008; Sims, 2008; Pandita y Richardson, 2009).

Dentro de las modificaciones covalentes de las histonas se encuentra la poli-acetilación de las histonas, la cual fomenta la estructuración de una cromatina abierta y por lo tanto transcripcionalmente activa, mediante cambios en la estructura nucleosomal que ocasionan la neutralización de cargas entre el ADN y las regiones amino-terminales de histonas. Por el contrario, la des-acetilación tiene que ver con la formación de una cromatina compacta y represora para la transcripción (Lachner y Jenuwein, 2002; Lund y van Lohuizen, 2004; Wang et al., 2007).

Por otro lado se ha demostrado que los residuos de lisinas pueden mono, di o trimetilarse, mientras que las argininas solo pueden mono o dimetilarse. Dichas modificaciones tienen repercusiones en la estructuración específica de la cromatina y su reconocimiento por parte de proteínas ligadas a la modulación de la estructura de la cromatina (ver Tabla 1 y Figura 4; Jenuwein y Allis, 2001). Como ejemplo, la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 tiene que ver con la estructuración de una cromatina represiva para la transcripción, mientras que la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 se relaciona con la formación de una cromatina abierta y por tanto transcripcionalmente activa (ver Tabla 1 y Figura 4; Santos-Rosa y Caldas, 2005). Dicho proceso es llevado a cabo por enzimas con un dominio SET, como por ejemplo las metil-transferasas de histonas Su(var),



Enhancer de Zeste (EZH2) y Trithorax (Trx), entre otras (Santos-Rosa y Caldas, 2005).

Modificación	Residuo de aminoácidos modificados	Histona	Efecto
<b>Fosforilación</b>	Treoninas/Serinas	H3,H4, H2A y H2B	Condensación de cromosomas y activación génica
<b>Acetilación</b>	Lisinas	H3,H4, H2A y H2B	Activación génica
<b>Descetilación</b>	Lisinas	H3,H4, H2A y H2B	Represión génica
<b>Metilación</b>	Lisinas/Argininas	H3,H4, H2A y H2B	Activación y represión génica
<b>Desmetilación</b>	Lisinas/Argininas	H3,H4, H2A y H2B	Activación y represión génica
<b>Isomerización</b>	Prolinas	H3	Activación génica
<b>Ubiquitinación</b>	Lisinas	H2A y H2B	Activación génica

**Tabla 1.** Principales modificaciones post-traduccionales de las histonas.

### 2.2.1- Las desmetilasas de histonas.

Hace poco tiempo, la metilación de las histonas era considerada como una modificación permanente e irreversible, que definía un estado epigenético sumamente estable. Recientemente se han descubierto un número considerable de enzimas que tienen la habilidad de desmetilar a los residuos de argininas y lisinas metiladas en las histonas de manera altamente específica. Los procesos que están involucrados con la desmetilación de las histonas son variados e incluyen a la oxidación de aminas, la hidroxilación o deaminación de las mismas (Shi et al., 2004; Huang et al., 2006; Yamane et al., 2006; Cloos et al., 2008; Xiang et al., 2007).

Dentro de las más estudiadas desmetilasas de histonas se cuenta con la amina oxidasa LSD1; esta es una des-metilasa de histonas la cual utiliza dinucleótido de adenia flavina (FAD) para catalizar la desmetilación de histonas. Dicha enzima, tiene la capacidad de desmetilar únicamente a los residuos mono y dimetilados de las lisinas 4 de histona H3 que corresponde a una marca asociada con zonas de eucromatina, potenciadores o enhancers y promotores génicos (Kubicek y Jenuwein, 2004; Takeuchi, et al., 2006; Lan, et al., 2008; Cloos, et al., 2008). Posteriormente, se describieron otro tipo de desmetilasas de histonas provenientes de la familia de proteínas *jumonji*, estas tienen la capacidad de desmetilar a los residuos de mono, di y trimetilación de las lisinas y argininas. Estas enzimas contienen un dominio conservado conocido como JmjC el cual fue descrito por primera vez en la proteína Jumonji JARID2 (Cloos et al., 2008). Hasta ahora se han reportado 27 proteínas con domino JmjC de las cuales 15 tienen la capacidad de desmetilar tanto residuos de argininas como lisinas de la histona H3. Especialmente las proteínas JMJD2A, JMJD2B, y JMJD2C han sido asociadas con la disminución global de las marcas H3K9me3 y H3K9me2 y la deslocalización de la proteína de heterocromatina 1 (HP1) (Schotta et al., 2003). El descubrimiento de desmetilasas de histonas representa un evento relevante en el campo de la regulación epigenética dado que ha cambiado en muchos aspectos la visión de la regulación epigenética, en donde muchas modificaciones covalentes de las histonas ahora pueden considerarse como reversibles. Esto trae como consecuencia una imagen global de cambio dinámicos en la expresión génica que pueden modularse de manera específica, en distintos procesos como diferenciación de células totipotenciales, *trans*-diferenciación de macrófagos en

respuesta a inflamación entre otros (De Santa et al., 2007; Loh et al., 2007; Cloos et al., 2008). Además, el entender los mecanismos de acción de estas desmetilasas de histonas puede llevarnos muy probablemente al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

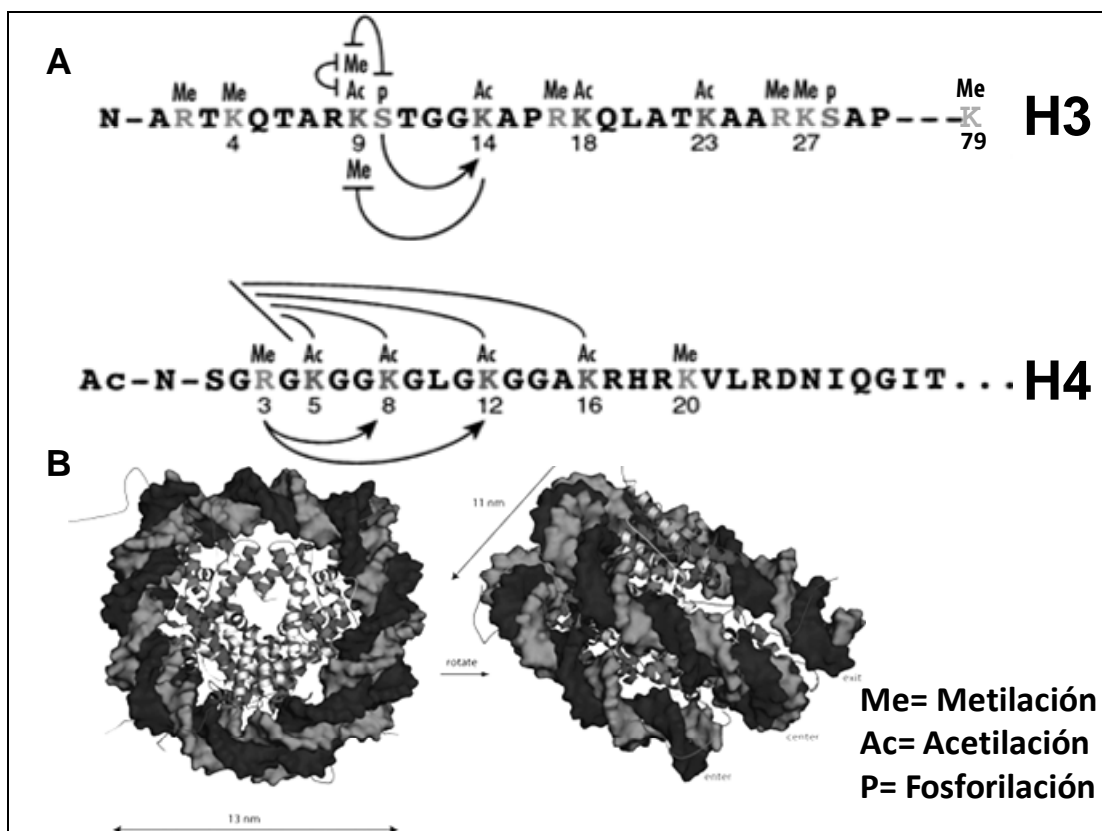
### **2.2.2- Las variantes de histonas.**

La visión de procesos epigenéticos dinámicos se ha enriquecido aún más con la caracterización de diversas variantes de histonas. Estas han tomado especial importancia debido a que muchas de ellas se han visto involucradas en el remodelaje alternativo de la cromatina, además de complementar y sofisticar el código de señales epigenéticas que adquiere cada nucleosoma (Hake y Allis, 2006).

Una de las primeras variantes de histonas descubiertas fue la variante CENP-A. Esta presenta una región amino-terminal que es variable en tamaño y secuencia, y es una pieza clave del ensamblaje del cinetocoro en los centrómeros de mamíferos (Allshire y Karpen, 2008).

Otro ejemplo es el reemplazo de la histona H3 canónica por la variante de histonas H3.3, la cual difiere de la histona H3 por sólo 4 residuos de aminoácidos. Un aspecto importante es que su incorporación a la cromatina se da durante todo el ciclo celular, mientras que la H3 canónica se deposita estrictamente en las horquillas de replicación (McKittrick et al., 2004). La histona H3.3 se ha visto enriquecida en sitios activos de transcripción, donde tiene la capacidad de reemplazar a la histona H3 (Janicki et al., 2004). Otra variante de histonas asociada con cromatina activa es H2A.Z, esta se incorpora cerca de regiones silenciadas, lo

cual sugiere que evita la propagación de la heterocromatina (Janicki et al., 2004). Curiosamente, esta misma variante ha sido localizada en sitios activos a nivel regulatorio como lo son los enhancers e “insulators” (límites de dominios) (Felsenfeld y Jin 2007; Jin et al., 2009). Actualmente se ha sugerido que muchos de estos procesos epigenéticos establecen una memoria epigenética, que pudiera tener un efecto directo en la transcripción génica.



**Figura 4.** Modificaciones covalentes de las regiones amino-terminales de las histonas. **A-** Representación esquemática de los principales residuos de aminoácidos que pueden modificarse covalentemente en las histonas H3 y H4. Me, representa metilación, Ac, acetilación y P, fosforilación. **B-** Esquema de la estructura del nucleosoma en vista frontal y lateral.

### 2.3- La familia de proteínas Polycomb y Trithorax.

Uno de los procesos epigenéticos asociados a la memoria epigenética son los miembros de la familia de proteínas Polycomb y Trithorax. Durante la década

de los 90s, se descubrió que los genes homeóticos en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* presentaban un comportamiento muy distinto de expresión para dos clases de elementos regulatorios en *cis* conocidos como iniciadores y elementos de mantenimiento (Actualmente llamados elementos de respuesta al grupo Polycomb/Trithorax ó PRE/TRE) (Ringrose y Paro, 2007). Especialmente se observó que los grupos de proteínas Polycomb (PcG) y Trithorax (TrxG) tienen la capacidad de unirse a estas secuencias PRE/TRE presentando funciones regulatorias antagónicas entre sí (Ringrose y Paro, 2007). Especialmente se observó que TrxG se asocia a elementos que se mantienen transcripcionalmente activos, mientras que PcG se vincula a aquellos que requerían ser silenciados (Moehrle y Paro, 1994). Alguna de las subunidades que conforman a los complejos TrxG y PcG poseen actividad de metil-transferasas de histonas con la capacidad de metilar lisinas específicas distribuidas en la región amino-terminal de H3; mientras que otros componentes interpretan dichas marcas.

Particularmente, el complejo TrxG es un grupo proteico heterogéneo, donde co-existen componentes peptídicos que forman parte de complejos remodeladores de la cromatina ATP dependientes como SWI/SNF (ver Tabla 2). Otro de los componentes de este complejo son las metil-transferasas de histonas con dominio SET como Ash2 y MLL las cuales se han visto involucradas en la metilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me3) que representa a una marca asociada con activación transcripcional (Lund y van Lohuizen, 2004; Cernilogar y Orlando, 2005). En condiciones aberrantes como leucemias, el gen *MLL1* se ha visto frecuentemente involucrado en diferentes translocaciones específicas como la del

sitio 11q23 que corresponde a la translocación t(4;14) (Djabali et al., 1993; Chesi et al., 1998).

Complejos Trithorax	<i>Drosophila melanogaster</i>	Humano
<b>SWI/SNF</b>	Brm	BRM
	Osa	BAF250
	Moirá	BAF170
	Shr1	BAF47
<b>NURF</b>	Iswi	SNF2L
	N38	?
	N301	BPTF
	N55	RpAp46 RpAp48
<b>TAC1</b>	Trxa	
	dCBP	
	Sbf1	
<b>Ash1</b>	Ash1	
	dCBP	
<b>MLL1-3</b>		MLL13a
		WDR5
		ASH2L
		RbBP5
		CFP1

**Tabla 2.** Componentes proteicos en *Drosophila melanogaster* y humanos del complejo Trithorax (Schuettengruber et al., 2007).

Por otro lado, las proteínas del grupo Polycomb (PcG) están relacionadas con la represión transcripcional. Estos complejos multipéptidicos están divididos funcionalmente en dos grupos: el complejo represor de iniciación (PRC2) que está conformado por EZH2, EED el cual recluta a des-acetilinasas de histonas y a su vez ancla al complejo PcG mediante el factor transcripcional YY1 (ver más adelante; Van der Vlag y Otte, 1999; Satijn et al., 2001), y SUZ12, entre otro componentes. Mientras que el de mantenimiento (PRC1) incluye proteínas como RNF2, Ring 1A y 1B, HPC, EDR y BMI1, y (ver Tabla 3 y Figura 5A; Lund y van Lohuzein, 2004). Cabe destacar que la proteína Enhancer de Zeste 2 (EZH2) es

una metil-transferasa de histonas con dominio SET, la cual tiene la capacidad de trimetilar a la lisina 9, pero principalmente a la lisina 27 de la histona H3 (H3K9me3 y H3K27me3), ambas marcas asociadas a la represión transcripcional (Lund y van Lohuizen, 2004). La marca H3K27me3 atrae y es reconocida a su vez por el cromodominio de Polycomb presente en el complejo PRC1 de mantenimiento. Además de sus funciones regulatorias en los genes homeóticos, ambos complejos participan en el control de ciclo celular, diferenciación, hematopoyésis, la capacidad auto-renovativa de las células embrionarias (ES) pluripotenciales, entre otros. De igual forma su des-regulación transcripcional se ha observado en cáncer, donde se ha reportado la sobre expresión de EZH2 en cáncer mamario y de próstata (Varambally et al., 2002; Kleer et al., 2003). Por si fuera poco, recientemente se ha reportado que la sobre-expresión de EZH2 en cáncer, puede asociarse con la inactivación de microRNAs como el *mir-101* regulan negativamente a esta metil-transferasa de histonas (Varambally et al., 2008).

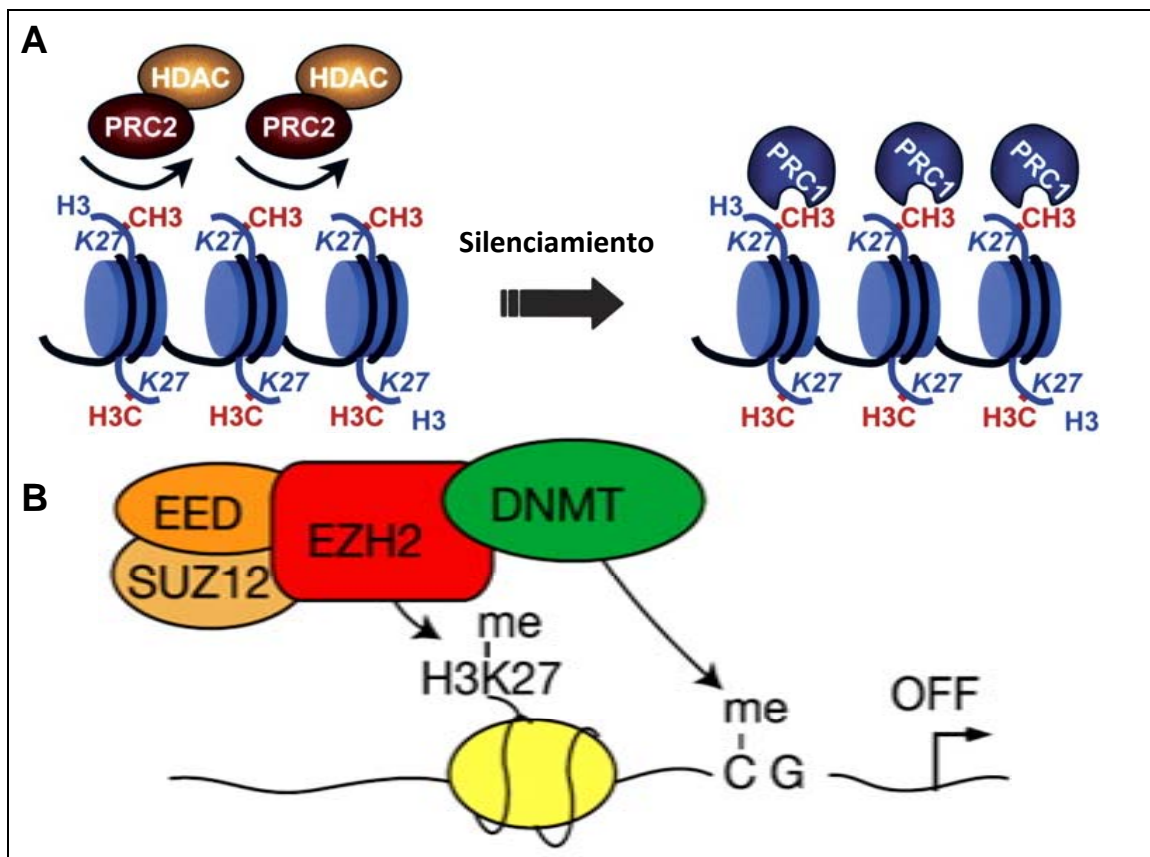
Complejos Polycomb	<i>Drosophila melanogaster</i>	Humano
<b>PhoRC</b>	dSfmbt	?
	Pho	YY1
<b>PRC2</b>	E(z) Esc	EZH2 EED
<b>PRC1</b>	Su(z)12 N55 dRing Pc	SUZ12 RpAp48 RpAp46 RING1A HPC1-3
	Ph	HPH1-3
	Psc	BMI1
	Scm	SCMH1-2
	Factores asociados TBP	

**Tabla 3.** Componentes proteicos en *Drosophila melanogaster* y humanos del complejo Polycomb (Schuettengruber et al., 2007).

Una de las incógnitas relacionadas con el estudio de los miembros de PcG/TrxG es que únicamente han sido caracterizadas secuencias PRE/TRE en *Drosophila*, por lo cual se desconoce de qué manera los miembros de PcG/TrxG son reclutados en mamíferos y otras especies. En la actualidad se ha reportado que el factor transcripcional YY1 homólogo de Pho en *Drosophila* es uno de los pocos factores transcripcionales con la capacidad de reclutar a miembros de Polycomb, lo cual abre una nueva ventana en el estudio del reclutamiento regulado de estos componentes proteicos a un sitio específico (Thomas y Seto, 1999; Atchison L, et. al., 2003; Srinivasan y Atchison, 2004; Ficz et al., 2005; Ringrose y Paro, 2007; Ko et al., 2008). Otra de las interrogantes de este campo de estudio es que actualmente se desconoce como las marcas covalentes de las histonas pueden asociarse a la memoria epigenética. Especialmente, los miembros de PcG y TrxG han sido ampliamente estudiados, el reclutamiento de los mismos, pero a su vez, se han propuesto como parte de la memoria epigenética post-mitótica (Hansen, et al., 2008). En publicaciones recientes, se ha demostrado que miembros del complejo PcG y en particular, EZH2 pueden mediar interacciones a distancia a escala intra- e inter-cromosómico, lo cual sugiere que la posible memoria epigenética se da a través de la deposición de la marca H3K27me3 (Tiwari et al., 2008). Una vez establecida dicha marca, es reconocida por PRC2 durante la fase G1 del ciclo celular manteniéndose a lo largo de la duplicación del ADN, manteniendo el mismo patrón epigenético en el genoma recién duplicado; mientras que la metil-transferasa de histonas EZH2 se mantiene asociada a la cromatina en las fases M y G0 del ciclo celular (Hansen et al., 2008). Además, en mamíferos existen evidencias de una inter-relación entre el



reclutamiento de miembros de Polycomb y las enzimas encargadas de metilar al ADN (Dnmts), donde EZH2 puede directamente reclutar a Dnmts a ciertos genes; esto permitiría de alguna forma dirigir la metilación de *ново* a genes que requieran un silenciamiento permanente (Lyko y Brown, 2005; Vire et al., 2006). Estos datos, que han resultado controvertidos, sugieren que múltiples procesos epigenéticos como componentes de PcG y la metilación del ADN, están directamente involucrados en el establecimiento de una memoria epigenética. Sin duda alguna, el entendimiento de estos procesos será de gran importancia dentro del estudio de la biología del cáncer.



**Figura 5.** Componentes asociados al grupo proteico Polycomb y su interrelación con otros componentes epigenéticos. **A-** Esquema de los dos complejos represores asociados a los miembros de Polycomb, PRC1 y PRC2. **B-** Dibujo que representa la interacción entre los componentes epigenéticos Polycomb (PRC2) y Dnmt (Vire et al., 2006)

#### **2.4- La metilación del ADN y el cáncer.**

Uno de los procesos epigenéticos más estudiados es la metilación del ADN, la cual en condiciones normales tiene que ver con múltiples procesos celulares tales como el desarrollo embrionario, transcripción, estructura de la cromatina, inactivación del cromosoma X, regulación de genes improntados y estabilidad cromosómica, entre otros (Singal y Ginder, 1999; Robertson, 2005). La metilación del ADN involucra una modificación química covalente a través de la incorporación de un grupo metilo ( $CH_3$ ) a la posición 5 del carbono de la citosina, reacción que se lleva a cabo mediante una metil-transferasa de ADN (tema que abordaremos a detalle más adelante). Esta modificación ocurre principalmente en la citosinas que se encuentran en el contexto de 5'-CpG-3' (también llamadas dinucleótidos CpGs), de manera menos frecuente se pueden observar en los dinucleótidos CpA y CCNGG entre otros (Das y Singal, 2004). Resulta importante mencionar que la metilación del ADN es sinónimo de silenciamiento génico, principalmente a través de la formación de una estructura de la cromatina compacta (Ehrlich, 2002).

En la actualidad se han desarrollado distintas estrategias experimentales que permiten la evaluación del estado de la metilación del ADN, las cuales van desde las muy generales, como la utilización de enzimas de restricción metilo-sensibles como MspI/HpaII, cuyo grado de digestión puede ser evidenciado por ensayos de Southern-blot. Por otro lado existen técnicas más específicas como la PCR sensible a metilación (MS-PCR) y un método más sensible basado en la

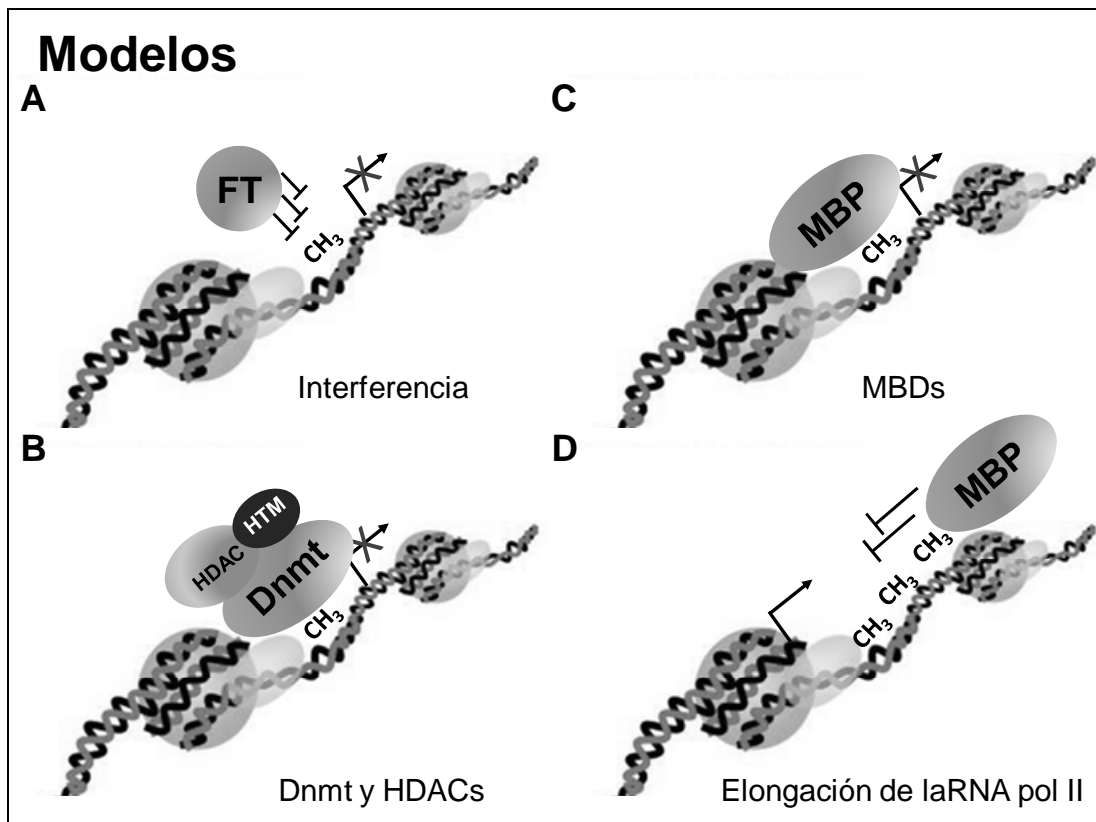
modificación del ADN genómico por bisulfito de sodio, amplificación específica por PCR, clonación y secuenciación. Esta última técnica permite evaluar cada uno de los CpGs potencialmente metilables, y determinar el estado de metilación en zonas que contienen mayor número de CpGs, conocidas como islas CpGs (que se describirán con mayor detalle más adelante).

Los mecanismos que se han sugerido para explicar el efecto de la metilación del ADN sobre la inactivación de la transcripción génica son los siguientes (Figura 6):

- a) El modelo de interferencia: Este sugiere que la metilación del ADN interfiere con la unión de los factores de transcripción a su secuencia blanco (Watt y Molloy, 1998).
- b) El reclutamiento de desacetilasas de histonas (HDACs) mediado por la metil-transferasa de ADN (Dnmt1) y la acción conjunta de varios co-represores. Diversos estudios han también demostrado que la Dnmt1 puede reclutar a la HDAC1 en su porción amino-terminal, siendo que al momento de metilar el ADN, la HDAC1 favorece la desacetilación de las histonas, teniendo como resultado la formación de una cromatina más compacta y por ende, represiva para la transcripción. Este fenómeno también se ha observado con otro tipo de metil-transferasas de ADN como las Dnmt3a y Dnmt3b (Fuks et al., 2000).
- c) Mediante la unión de proteínas que se asocian al ADN metilado llamadas "Methyl-CpG-binding proteins" (MeCPs), también

conocidas como “Methyl-binding domain proteins” (MBDs): El reconocimiento de estas proteínas fomenta la generación de una cromatina compacta afectando a la expresión génica, mediante la atracción de co-represores los cuales incorporan a HDACs (Lopez-Serra y Esteller, 2008). Las proteínas de unión al ADN metilado han sido vinculadas con el silenciamiento transcripcional de múltiples genes en contextos aberrantes como el cáncer (ver Tabla 2).

- d) La metilación del ADN en el cuerpo del gen. Se ha demostrado que la metilación en el cuerpo del gen puede reclutar proteínas de unión al ADN metilado que evitan la elongación de la RNA polimerasa II (Zilberman et al., 2007). De manera contradictoria y controversial, existen reportes que descartan dicho modelo, sugiriendo que la metilación del ADN en el cuerpo del gen no afecta la expresión del mismo.



**Figura 6.** Modelos de silenciamiento epigenético mediado por la metilación del ADN. **A-** Modelo de interferencia, donde la metilación del ADN interfiere con la unión de los factores de transcripción a su secuencia blanco. **B-** Reclutamiento de desacetilasas de histonas (HDACs) mediante las enzimas encargadas de metilar al ADN (Dnmts). **C-** Las proteínas de unión al ADN metilado (MBDs o MBP) reclutan co-represores, que a su vez se asocian con HDACs. **D-** La metilación en el cuerpo del gen puede evitar la elongación de la RNA pol II vía estructuración compacta de la cromatina.

La metilación del ADN se ha convertido en un campo muy importante de estudio en el área del cáncer, donde se han demostrado dos procesos ligados al desarrollo del cáncer: (1) La hipermetilación específica de promotores de genes asociados al control del ciclo celular, entre otros, y (2) la hipometilación global del genoma, particularmente de secuencias repetidas, las cuales abordaremos a mayor detalle más adelante. De manera normal el genoma de mamíferos se encuentra metilado aproximadamente en el 70% de los dinucleótidos CpGs, mayoritariamente en regiones centroméricas y subteloméricas. En procesos

tumorales se ha observado una hipometilación global del ADN en comparación con su contraparte de tejido normal (Feinberg y Vogelstein, 1983; Baylin y Herman, 2000; Robertson, 2005). Este fenómeno trae como consecuencia la inestabilidad de dichas regiones genómicas, las cuales pueden incluso llevar a la pérdida de fragmentos de cromosomas.

Por otra parte, se ha visto un vínculo entre los procesos genéticos y epigenéticos, dado que los sitios metilados pueden sufrir un cambio de G a T mediante una reacción de deaminación, y por lo tanto, un proceso epigenético puede llevar a un defecto a nivel genético. Este fenómeno se ha observado frecuentemente en el cuerpo del gen *p53* humano en muestras de tumores de cáncer de pulmón (Esteller et al., 2001).

Paradójicamente, se puede presentar una hipermetilación del ADN a nivel local, afectando principalmente a regiones promotoras de genes asociados al control del ciclo celular como los genes supresores de tumores, y reparación del ADN tales como *hMLH1*, *p16<sup>INK4a</sup>*, *BRCA1*, *p73*, *HIC-1* y *Rb* entre otros (Hanahan y Weinberg 2000; Esteller, 2005). Se ha propuesto que la des-regulación de las enzimas responsables del mantenimiento de la metilación del ADN y del establecimiento de la metilación de *novo* (Dnmts) pueden ser en parte responsables tanto de la pérdida y ganancia de metilación del ADN en procesos tumorales (Morey Kinney et al., 2008). A pesar de todas estas propuestas aún quedan muchos aspectos desconocidos de la metilación del ADN que deben ser investigados con mayor detalle.

## **2.5- Las metil-transferasas de ADN (Dnmts).**

Las proteínas encargadas de metilar el ADN se denominan ADN metiltransferasas (Dnmt). Hasta ahora se han descrito 7 enzimas (Dnmt1, Dnmt1b, Dnmt1o, Dnmt1p, Dnmt2, Dnmt3a, Dnmt3b (con una isoforma Dnmt3 Like-protein (Dnmt3L)). En particular, la Dnmt3 se asocia con la metilación del ADN de genes improntados exclusivamente en células germinales (Cheng y Blumenthal, 2008), en donde las más estudiadas son las Dnmt3a, Dnmt3b y la Dnmt1. Dentro de la metilación del ADN existe la metilación de *novo* y la de mantenimiento, lo cual permite que dicha información epigenética se establezca en etapas tempranas del desarrollo y por otra parte, que se transmita a las células hijas durante la duplicación celular, respectivamente (Esteller, 2005). La Dnmt1 está involucrada en ambas actividades, mientras que la Dnmt3A y Dnmt3b mayoritariamente presentan actividad *de novo* en etapas tempranas del desarrollo (Robertson, 2002; Goll y Bestor, 2005).

La importancia en el estudio de la metilación del ADN estriba en que dicho proceso epigenético se asocia a múltiples enfermedades como el cáncer. Esta asociación fue demostrada en 1983, cuando se determinó experimentalmente que las células cancerosas presentan un genoma globalmente hipometilado (Feinberg y Vogelstein, 1983; Feinberg y Tycko, 2004). Debido a la importancia que representa la regulación epigenética, en la actualidad muchas investigaciones se han centrado en el estudio de la regulación de las Dnmts (Dean et al., 2005; Esteller, 2005). Recientemente, se ha reportado que el incremento en la expresión del gen que codifica para la Dnmt1 puede estar mediado por la interleucina 6 (IL-6), la cual está involucrada en procesos inflamatorios. A su vez dicho incremento ha sido correlacionado con una disminución importante en la transcripción del gen

supresor de tumores *p53* (Hodge et al., 2005). Esto apoya la relevancia que tiene la propia regulación de las Dnmts en la inactivación de genes supresores de tumores. Sorpresivamente, una serie de trabajos de investigación demostraron que la mutación homocigota del gen *Dnmt1* causa una disminución del 20% en la metilación global del ADN, mientras que la inactivación de la *Dnmt3b* causa sólo un 3%. Pero en conjunto, la inactivación de ambas Dnmts (*Dnmt1* y *Dnmt3b*) causa una pérdida del 95% de la metilación (Rhee et al., 2002). Estos datos sugieren que ambas enzimas cooperan en el mantenimiento de la metilación del ADN. De hecho, mutaciones en la *Dnmt3b* se han reportado en algunos síndromes como en el síndrome de la inmunodeficiencia, inestabilidad centrómerica y anomalías faciales (ICF) causando la muerte en la adultez (Cheng y Blumenthal, 2008).

En resumen, la metilación del ADN es un proceso epigenético que, en condiciones normales está asociado con la estabilidad genómica y la expresión génica en un espacio y tiempo definido. En condiciones aberrantes como el cáncer, está estrechamente ligado con el silenciamiento epigenético de múltiples genes, en especial aquellos asociados con el control del ciclo celular, como también en la inestabilidad del genoma (Feinberg et al., 2006).

## **2.6- Las proteínas de unión al ADN metilado.**

Hasta ahora se han descrito al menos seis proteínas de unión al ADN metilado (MBDs) como son MBD1, MBD2, MBD3, MeCP2, y KAISO, las cuales están involucradas en la represión transcripcional, mientras que MBD4 tiene funciones de reparación del ADN (Clouaire y Stancheva, 2008). Las MBDs interactúan con enzimas modificadoras de histonas como las HDACs que



promueven el establecimiento de una cromatina transcripcionalmente inactiva. En genes aberrantemente metilados, se ha observado la unión al ADN metilado de diversas combinatorias de dichas proteínas (ver Tabla 4; Lopez-Serra y Esteller, 2008). Especialmente, se ha reportado que algunos promotores de genes presentan un reclutamiento particular de proteínas de unión al ADN metilado lo cual sugiere cierta especificidad de reconocimiento para dichas proteínas. En dicho estudio se observó que tanto MeCP2 y MBD2 son reclutadas específicamente a 22 promotores de genes, mientras que MBD1 y MBD3 no presentan dicho patrón (Lopez-Serra et al., 2006). El mismo estudio en líneas celulares de diferentes tipos de tumores demostró que la distribución de las MBDs puede observarse de manera distinta afectando la expresión de diferentes genes dependiendo del tipo de cáncer. Estos resultados sugieren que dependiendo el tipo de promotor que está afectado y el estirpe celular conlleva a distintos patrones de represión vía procesos epigenéticos ligados a la acción de combinaciones particulares de proteínas de unión al ADN metilado. También se ha reportado la ausencia de este tipo de proteínas en cánceres de colon y pulmón sugiriendo que cada cáncer puede presentar una firma particular de proteínas de unión al ADN metilado (Bader et. al., 2003; Zhu et al., 2004).

Por otra parte, mutaciones en el gen que codifica para la proteína de unión al ADN metilado, MeCP2 ha sido asociado con el síndrome de retraso mental Rett mayoritariamente en mujeres. En esta enfermedad los pacientes presentan un desarrollo normal hasta los 6 a 18 meses de edad, para progresivamente ir perdiendo habilidades cognitivas, sociales y motoras (Urduguio et al., 2008).

Proteína de unión al ADN metilado	Genes Blanco
MeCP2	<i>RASSF1A, RARB2, GSTP1, MGMT, CDH1, CDH13, LTBP3, PARVG, COLL11A2</i>
MBD1	<i>GSTP1, SOCS-1, COL11A2, PTPRN, FGF19, RARB2, CDH1</i>
MBD2	<i>BRCA1, MGMT, p16INK4a, p14ARF, LTBP3, PTPRN, ER1, TIMP3, CDH1, GSTP1, PRLR, PTPN4</i>
MBD3	<i>P21, CHFR, PTPN4</i>
MBD4	<i>p16INK4a, MHL1</i>

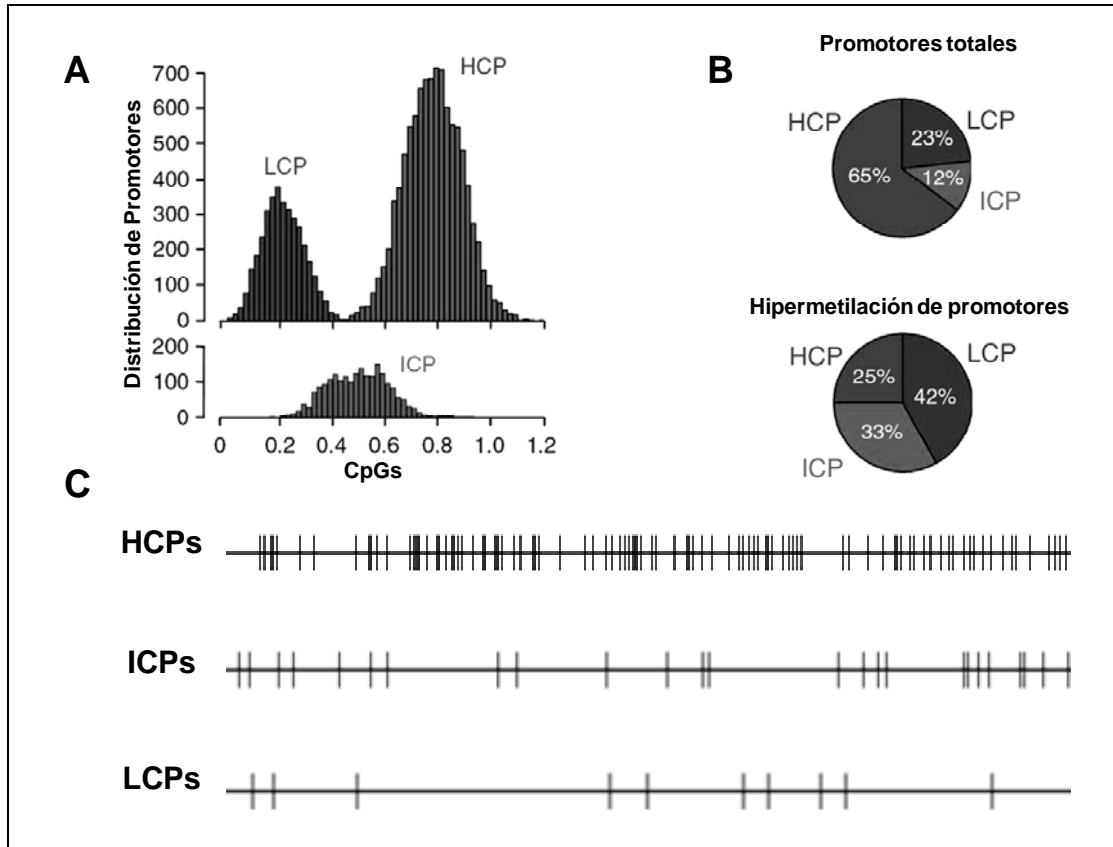
**Tabla 4.** Ejemplos de genes blanco específicos de proteínas de unión al ADN metilado (MBDs). (Tomado de Lopez-Serra, et al., 2008)

## 2.7- Las islas CpGs, sus funciones biológicas y su nueva clasificación.

Dentro del genoma existen zonas que abarcan de 0.2 a 1 kb ó más, con una densidad mayor al 60% de los nucleótidos C y Gs, donde la probabilidad de encontrar un dinucleótido CpG es mayor. A estas zonas genómicas se les denominó “islas CpGs” (Antequera 2003; Issa, 2004). Estas islas están presentes principalmente en el costado 5' del 60% los genes transcritos por la RNA polimerasa II, coincidiendo frecuentemente con su región promotora y el primer exón. De manera interesante, en condiciones normales se encuentran libres de metilación del ADN, con excepción de algunos genes con expresión mono-alélica (también conocidos como genes improntados) (Gonzalzo y Jones, 1997; Ng, 1999; Baylin et al., 2000; Bird, 2002). Actualmente y basados en estudios globales a escala genómica se ha propuesto una nueva clasificación para la “isla CpG”. Mediante la técnica de “ChIP-on-chip” se dedujeron tres nuevas clases de promotores con diferentes densidades de CpGs (Weber et al., 2007). Estas se clasificaron dependiendo de la distribución de dinucleótidos CpGs en: alta densidad (HCPs), intermedia (ICPs) y baja (LCPs) (Figura 7A y C). Interesantemente, se observó que los promotores con islas HCPs, por lo general

no están metilados, pero de manera aberrante su metilación se asocia con un silenciamiento epigenético; mientras que las islas ICP y LCP presentan un mayor número de CpGs metiladas, sin que esto afecte dramáticamente su función regulatoria y por ende la expresión génica, es decir, no se silencian epigenéticamente (Figura 7B). Datos de la literatura y resultados presentados en este trabajo de investigación sugieren fuertemente que los distintos tipos de las islas CpGs tienen repercusiones biológicas y por ende regulatorias, en particular a nivel epigenético. Estudios recientes (incluyendo los de nuestro grupo) han propuesto que los mecanismos de silenciamiento epigenético son distintos dependiendo de la clase de islas CpGs que correspondan para cada uno de los promotores (Figura 7; Weber et al., 2007; Kondo et al., 2008; Meissner et al., 2008). De manera normal, los promotores de genes asociados a islas CpGs se mantienen libres de metilación, pero en eventos como el cáncer sufren una hipermetilación. Esto ha sido una pregunta ampliamente abordada, debido a que actualmente se desconocen los mecanismos asociados en la protección de la metilación del ADN anormal de las islas CpGs. Hasta ahora se han propuesto distintos mecanismos de protección: Una transcripción activa de los genes, eventos de desmetilación del ADN (en caso de que existan enzimas para ello), la duplicación y la estructuración local de la cromatina, pueden ser los procesos responsables de evitar el acceso de las enzimas encargadas de metilar el ADN (Antequera, 2003; Das y Singal, 2004; Esteller, 2005). Todos los mecanismos antes propuestos pueden sufrir alteraciones que repercuten en el silenciamiento de genes, muchos de ellos involucrados en el control del ciclo celular, como los

genes supresores de tumores, y/o activación de proto-oncogenes que abordaremos a continuación.



**Figura 7.** Representación gráfica de los tres tipos de promotores con islas CpGs. **A-** Distribución de promotores con relación a su densidad de CpGs. **B-** Porcentaje de promotores totales distribuidos en las islas CpGs y su estado de metilación. **C-** Ejemplos de la distribución de los CpGs en las tres islas CpGs (Alta densidad (HCPs), Intermedia densidad (ICPs), y Baja densidad (LCPs)) (Tomado de Weber et al., 2007).

### **3- LOS ONCOGENES Y GENES SUPRESORES DE TUMORES.**

#### **3.1- Los oncogenes.**

A finales del siglo XIX, el célebre científico Theodor Boveri postuló la existencia de estímulos de crecimiento “cromosómico” que permitía un desarrollo descontrolado de tumores, los cuales eran atribuidos al incremento en número de estos componentes (Balmain, 2001). Pero fue hasta 1911 con Peyton Rous que se dieron las primeras evidencias de la existencia de los oncogenes. Este investigador realizó trabajos sobre el virus del sarcoma de Rous (RSV), demostrando que dicho virus estaba relacionado con la formación de sarcomas en pollos (Rous, 1910). Posteriormente, Michael Bishop y Harold Varmus en 1977 demostraron que los pollos y otras especies contenían endógenamente a un gen muy similar al observado en el RSV (el gen viral v-src) al cual se denominó c-src (Varmus et al., 2008). Estos resultados sugerían que la incorporación de una versión mutada del virus endógeno producía el desarrollo de tumores (Varmus et al., 2008). Todos estos estudios dieron origen al estudio de los oncogenes y su relación con el cáncer. Actualmente se sabe que los proto-oncogenes son genes que codifican para proteínas involucradas en la proliferación celular e inhibición de la apoptosis, cuando estos se sobre-expresan de manera descontrolada se les define como oncogenes. Estos pueden ser activados por varios mecanismos como mutaciones o fusión génica por la yuxtaposición de elementos tipo enhancer o amplificación génica. Especialmente los oncogenes codifican para seis tipo de proteínas como factores transcripcionales (como Fos, Jun y Myc), remodeladores de la cromatina (como SWI/SNF y MLL), factores de crecimiento (PDGF y proteínas de la vía de WNT como las  $\beta$ -cateninas), receptores de factores de



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

crecimiento (como el receptor epidermal del crecimiento EGFR, factor de crecimiento endotelial VEGF entre otros), transductores de señales (como Ras, AKT y SGK), y reguladores apoptóticos (como BCL2) (Croce, 2008). Actualmente uno de los nuevos candidatos de genes con función oncogénica son algunos microRNAs (He et al., 2005; Ma y Weinberg, 2008). Entre ellos destacan los *hsa-miR-155*, *hsa-miR-21*, *hsa-miR-372-373* y el *hsa-miR-17-92* (Ma y Weinberg, 2008; Medina y Slack, 2008). Particularmente el *hsa-miR-17-92* se ha visto sobre-expresado en linfomas de células B y cáncer testicular, donde inducen la sobre-expresión del oncogén c-Myc (He et al., 2005). Un ejemplo clásico de un oncogén es Ras, el cual es un proto-oncogén que codifica para proteínas de transducción de señales intracelulares; su des-regulación positiva se asocia con proliferación celular descontrolada (Malumbres y Barbacid, 2003). Por otro lado, los genes supresores de tumores representan la contraparte de los oncogenes, debido a que están involucrados en el control negativo del ciclo celular. Normalmente su función es el inhibir la proliferación celular y el desarrollo de tumores.

### **3.2- Los genes supresores de tumores**

La sobre-expresión de oncogenes representa solo una de las diversas alteraciones a nivel génico que conllevan a una proliferación celular descontrolada. La inactivación de los genes supresores de tumores (GST) también pueden ser desencadenantes en un proceso tumoral (Croce, 2008). Los GST representan la contraparte de los oncogenes, estos están involucrados en el arresto del ciclo celular. Normalmente su función es el inhibir la proliferación celular mediante el

control del ciclo celular, evitando así el desarrollo de tumores (Clurman y Mark, 1997). Es así como a finales de 1970 Knudson y colaboradores llevaron a cabo un estudio epidemiológico centrado en el cáncer familiar de Retinoblastoma en niños. Estos estudios derivaron en la postulación de la hipótesis de los dos “hits” (también conocida como la hipótesis de Knudson), en donde se sugiere por primera vez, la existencia de genes asociados al control del ciclo celular, a los cuales posteriormente se les nombraron como “genes supresores de tumores”. A diferencia de los oncogenes, los GST necesitan ser afectados en ambos alelos para su inactivación. La alteración de uno de los alelos puede derivar en una susceptibilidad al desarrollo de tumores (fenómeno conocido como haploinsuficiencia).

Hasta ahora, han sido descritos más de 174 genes supresores de tumores entre los que se encuentran *Rb*, *MGMT*, *BRCA 1/2*, *VHL*, *APC* y *p53*, entre otros (Yang y Fu, 2003). En la actualidad existen nuevos candidatos a GST en donde algunos microRNAs tienen la capacidad de suprimir la expresión de oncogenes y pueden ser considerados como supresores tumorales (Ma y Weinberg, 2008). Como ejemplo los *hsa-mir-15a*, *hsa-miR-16* y *Let-7a* pueden inducir apoptosis debido a que estos tienen como blancos a genes anti-apoptóticos como *BCL2* y Caspasa 3 (Cimmino et al., 2005; Tsang y Kwok, 2008). Otro ejemplo es la familia de microRNAs let-7 los cuales se han identificado como supresores de los oncogenes *RAS* y *HMGA2* (Johnson et al., 2005; Boyerinas et al., 2008; Iliopoulos et al., 2009). Muchos de los GST pueden ser inactivados por defectos genéticos como mutaciones puntuales ó deleciones cromosómicas, pero no son los únicos fenómenos involucrados en el inicio ó desarrollo del cáncer; a su vez, hoy en día



se considera que los procesos epigenéticos también pueden ser responsables del silenciamiento de múltiples genes, y en particular de los GST (como la metilación del ADN y las modificaciones post-traduccionales de las histonas), derivando en el desarrollo del cáncer. Incluso, cabe recalcar, que la idea de una combinatoria tanto de los defectos genéticos como epigenéticos se refuerza cada día para explicar el origen y desarrollo del cáncer (Balmain, 2002; Feinberg et al., 2006).

Uno de los genes supresores de tumores que nos ha llamado la atención es el gen *p53* humano, debido a que no se conoce nada a cerca de su inactivación por mecanismos epigenéticos. Los pocos datos apuntan de manera indirecta, a que el promotor de este gen no es silenciado por metilación del ADN. Esto puede sugerir que otros mecanismos epigenéticos como las modificaciones post-traduccionales de las histonas contribuyan en la inactivación de la expresión de este gen. En la actualidad esta hipótesis se sustenta por el hecho de que el promotor de *p53* es considerado y clasificado como una isla CpG intermedia, lo cual sugiere su posible inactivación por mecanismos epigenéticos alternos a la metilación del ADN (Weber et al., 2007; Kondo et al., 2008).

#### **4- EL GEN SUPRESOR DE TUMORES P53 HUMANO.**

El gen *p53*, es uno de los más estudiados en cáncer debido a que se ha encontrado alterado en la mayoría de los tumores humanos, siendo una pieza clave para el inicio y desarrollo del cáncer. Por su papel en el ciclo celular, *p53* es considerado como “el guardián del genoma”, debido a que evita la acumulación de alteraciones genéticas, mediante el arresto del ciclo celular en G<sub>1</sub>/S o G<sub>2</sub>/M y la subsecuente activación de distintas vías de muerte celular ó apoptosis como



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

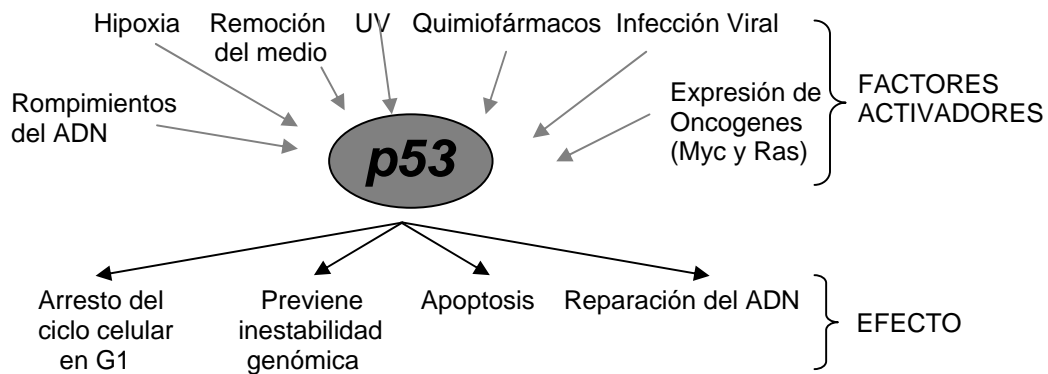
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

también induciendo reparación del ADN (Figura 8; Rotter, et al., 1994; Malkin, 2001). El gen *p53* pertenece a una familia multigénica que incluye a *p63* y *p73*. El locus de *p53* humano se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p13) y se localiza en una región genómica que abarca aproximadamente 20 kb (Soussi, et al., 1990). Hasta el momento no han sido reportados elementos de regulación a distancia que contribuyan a su transcripción, por lo cual la expresión de este gen se modula aparentemente a través de sus promotores.

#### **4.1- Los promotores del gen supresor tumoral *p53* humano.**

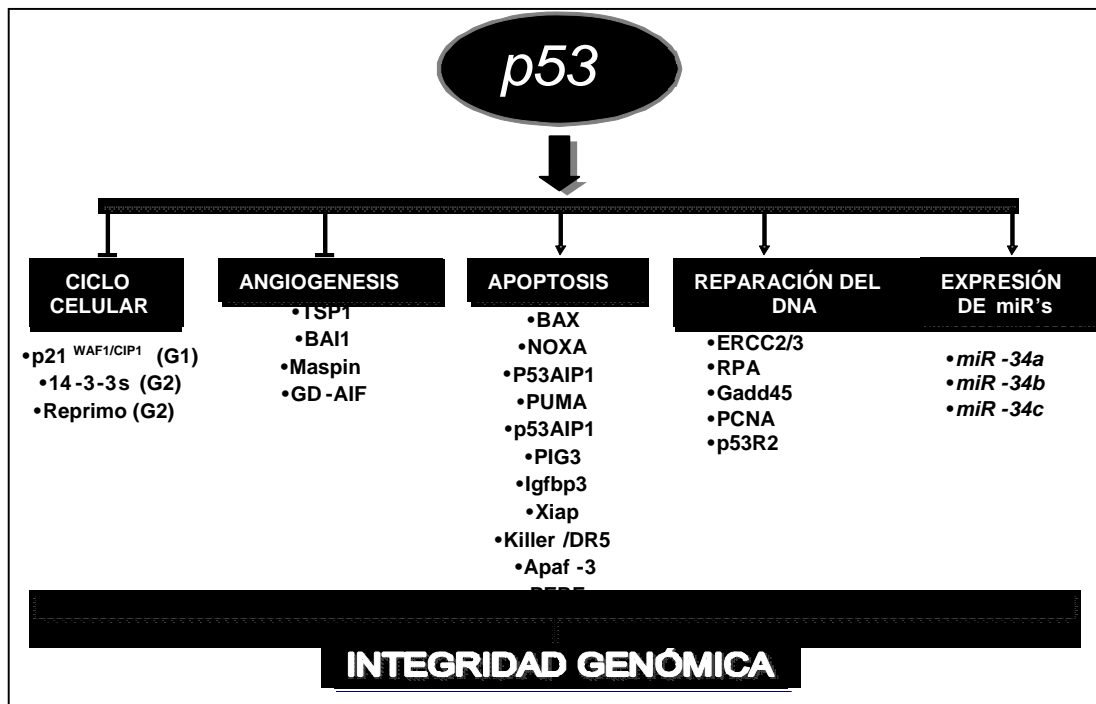
Este gen contiene un promotor principal (P1) y un promotor interno (P2) que puede transcribir a seis diferentes RNAs mensajeros codificando para seis isoformas proteicas distintas (lo cual abordaremos a detalle más adelante) (Tuck y Crawford, 1989; Bourdon et al., 2005). El promotor P1 humano no contiene un caja TATA o una secuencia consenso iniciadora, pero se ha postulado que una secuencia tipo "TAAAA" pudiera funcionar como un elemento tipo caja TATA (Bucher, 1990). El promotor P1 contiene secuencias de unión a distintos factores de transcripción (FT) que mayoritariamente se sitúan río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Entre ellos se presenta un miembro de la familia de PAX, el cual fue ubicado en el exón 1 no codificante de *p53* (+197 a +193) (Stuart et al., 1995). La abundancia de PAX5 está inversamente correlacionada con la expresión de *p53*, sugiriendo que dicho FT tiene actividad represora sobre la regulación de la expresión del gen (Stuart et al., 1995). Por otro lado, el heterodímero c-Myc/Max es reclutado a la secuencia 5'-CATGTG-3' localizado de -33 a -38 lo cual fomenta

la activación transcripcional de *p53* (Reisman et al., 1993 y 2004). El FT NF- $\kappa$ B (el cual se une a la secuencia localizada entre -40 a -60) es importante en la inducción de la transcripción en respuesta al daño en el ADN vía agentes genotóxicos como la luz UV, 5-fluorouracilo y mitomicina C (Sun y Yamamoto, 1995). De igual forma el promotor del gen *p53* presenta sitios de unión para los factores NF1 y YY1 en la posición -91 a -103 y -98 a -107, respectivamente los cuales han sido asociados tanto con activación y como con represión transcripcional (Furlong et al., 1996; Venanzoni et al., 1996). Por último, el FT AP1 se une a la secuencia localizada entre -155 a -166, en donde se ha sugerido que en conjunto con NF1 y YY1 funcionan como activadores transcripcionales (Kirch et al., 1999). Todos los FT previamente mencionados regulan la expresión del gen *p53* humano en un tiempo y espacio definido. Es bien sabido que en condiciones normales, tanto su expresión como la abundancia de la proteína son muy reducidas. Particularmente la presencia de la proteína Mdm2 es la encargada de degradar *p53* vía ubiquitinación (Nayak y Das, 1999; Yap et al., 1999). Datos recientes sugieren que la transcripción de un RNA antisentido denominado *Wrap53* co-localiza con la región promotora del gen *p53* humano. La ausencia de éste transcrito correlaciona con la disminución de la expresión del gen *p53*, lo cual sugiere otro nivel de regulación para el gen *p53* humano (Mahmoudi et al., 2009). Otro elemento que se ha visto involucrado en la regulación de la expresión de *p53* es el microRNA-125b, dado que la expresión de este se asocia con una regulación negativa de *p53* (Le et al., 2009).



**Figura 8.** Esquema de las señales que activan la transcripción del gen *p53* humano, así como algunos de los genes involucrados en dicha cascada y su efecto fisiológico.

El gen *p53* humano codifica en una proteína de 53 kDa con la cual tiene una actividad tipo factor transcripcional (FT). Este FT tiene múltiples genes blanco dentro de los que se encuentran aquellos involucrados en arresto del ciclo celular, inhibición de la angiogénesis, la muerte celular programada, la reparación del ADN y más recientemente la activación de microRNAs asociados con una función tipo GST (Ford, 2005; Resnick-Silverman y Manfredi, 2006; He et al., 2007; ver Figura 9).

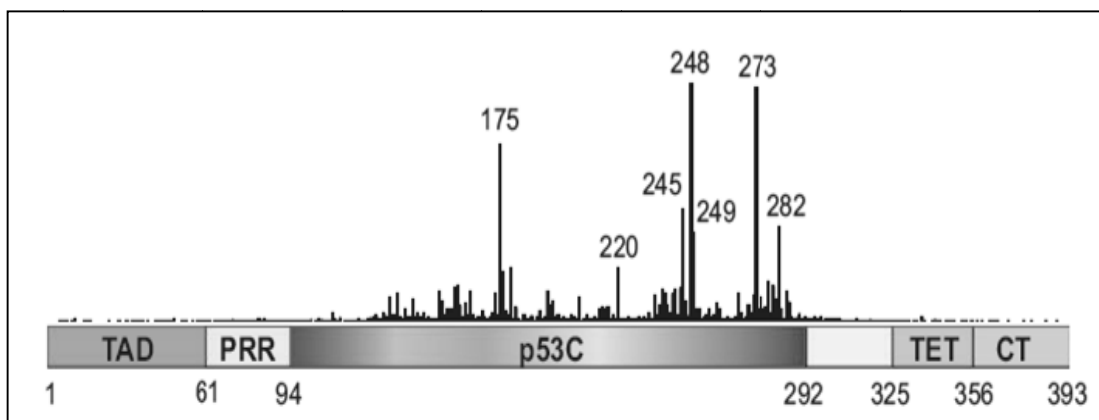


**Figura 9.** Cascada de activación de los genes asociados al factor transcripcional *p53* (modificada de Lois Resnick-Silverman, 2006).

#### 4.2- La proteína *p53* y su papel regulatorio en la homeostasis celular.

La proteína *p53* fue descrita por primera vez en 1979 (Lane y Crawford, 1979), pero fue hasta 1990 que se consideró como un gen supresor de tumores. El péptido *p53* está involucrado en diversos procesos celulares como regulación del ciclo celular, apoptosis, reparación, regulación transcripcional y remodelaje de la estructura de la cromatina, entre otras funciones (Vogelstein et al., 2000). La organización peptídica de *p53* está altamente conservada desde *Drosophila melanogaster* hasta el humano (Stiewe, 2007). La proteína *p53* humana presenta una masa molecular de 53 kDa, la cual está conformada por 393 residuos de aminoácidos. Dicha proteína se organiza en cuatro dominios estructurales y funcionales. Los primeros 42 residuos de aminoácidos pertenecen al extremo

amino-terminal y corresponden al dominio de activación; este dominio interactúa con la maquinaria basal de transcripción cuando requiere de su función de activación (Figura 11; Lu y Levine, 1995). La secuencia específica de unión al ADN se localiza entre los residuos 102 al 292 (Malkin, 2001). Esta zona es de suma importancia dado que más del 97% de las mutaciones del gen se ha caracterizado en esta región (Figura 10; Soussi et al., 2006; Petitjean et al., 2007; Stiewe, 2007). En particular se ha observado una mayor frecuencia de mutaciones para los codones 175, 245, 248, 273, y 282 (Figura 10). Coincidentemente, la mayoría de estos sitios contienen en la secuencia del ADN a los dinucleótidos CpGs metilados; este fenómeno promueve además (como se comentó anteriormente), mutaciones mediadas por la deaminación de la 5-metilcitosina originando una mutación de T-G (Soussi et al., 2006; Petitjean et al., 2007).



**Figura 10.** Esquema de los sitios con mayor frecuencia de mutaciones reportadas para los codones del gen *p53* humano (Soussi et al., 2006). La proteína de *p53* presenta distintos dominios, dentro del amino-terminal se encuentra el dominio de trans-activación (TAD), *p53C* es dominio de unión al ADN, TET dominio de tetramerización del péptido y el CT denota el carboxilo terminal.

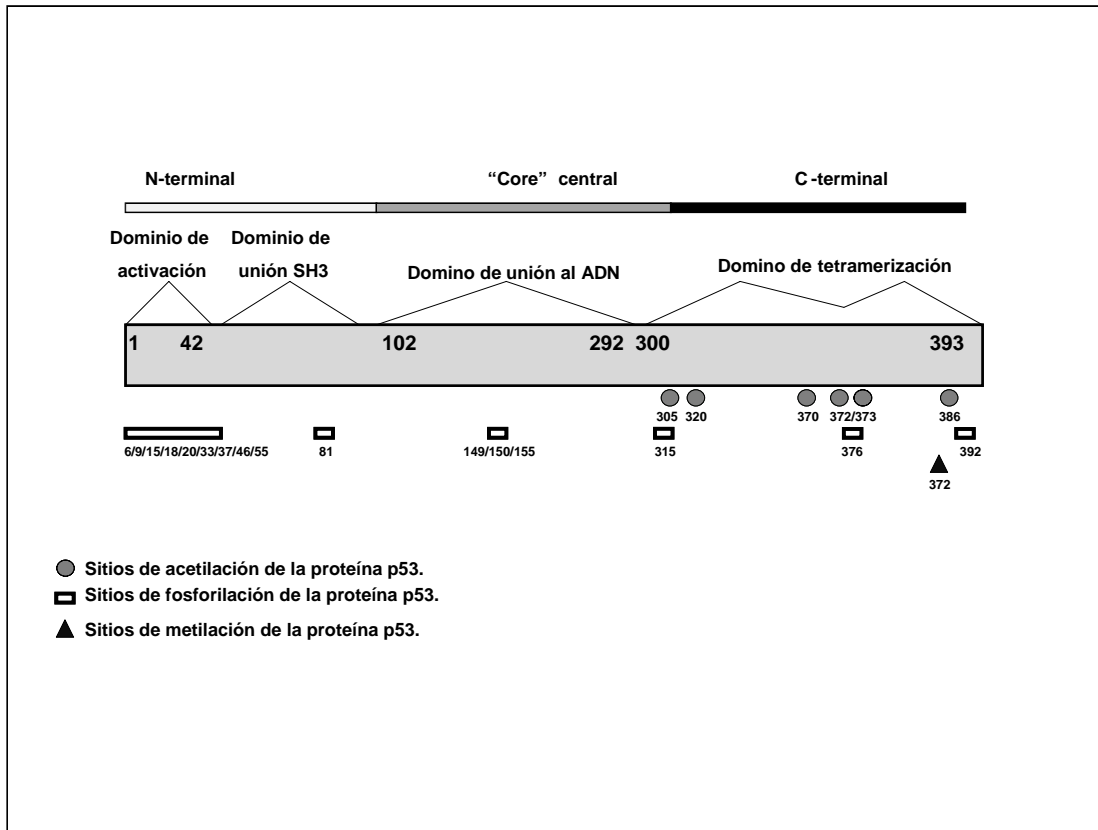
La región carboxilo-terminal se sitúa entre los residuos 323 al 356 (Bourdon, et al., 2005). Esta zona fomenta la oligomerización del tetrámero de la proteína, lo cual favorece la unión del péptido a su secuencia blanco en el ADN (Bode y Dong, 2004). Adyacente al dominio de oligomerización entre los residuos 363 al 393 se localiza el dominio de unión al ADN (Figura 11; Malkin, 2001). En conclusión, la estructura del péptido codificado por el gen *p53* es altamente compleja, la cual además puede ser finamente regulada por modificaciones post-traduccionales que le confieren a su vez especificidad tanto en su función como en su actividad, lo cual abordaremos a continuación (Espinosa y Emerson, 2001).

#### **4.3- Las modificaciones covalentes en el péptido de p53.**

La proteína de p53 sufre modificaciones post-traduccionales que le confieren actividades específicas (Feng, et al., 2005). Dentro de estas, se encuentra la fosforilación, cuyo efecto tiene que ver con la estabilización del péptido y una mayor afinidad por la unión a su secuencia blanco. En respuesta a daño al ADN, el péptido de p53 puede fosforilarse en la serina 15 mediante la cinasa ATM. Esta modificación post-traducciona l fomenta la unión de acetilasas, como p300 a la región amino-terminal de p53. Esto permite que el péptido a su vez puede acetilarse (Bourdon, et al., 2005). La acetilación de p53, ocurre en el extremo carboxilo-terminal del péptido. Dicha modificación es relevante para la estabilidad del péptido evitando su degradación vía MDM2, y a su vez incrementa su afinidad por el ADN (Bode y Dong, 2004; Feng, et al., 2005). Otro mecanismo recientemente descrito es la metilación de p53 en su dominio carboxilo-terminal mediada por la metil-transferasa Set9, contribuyendo a su translocación al núcleo,



confiriéndole estabilidad a la proteína y facilitando el reconocimiento de sus secuencias blanco (Figura 11; Chuikov et al., 2004).

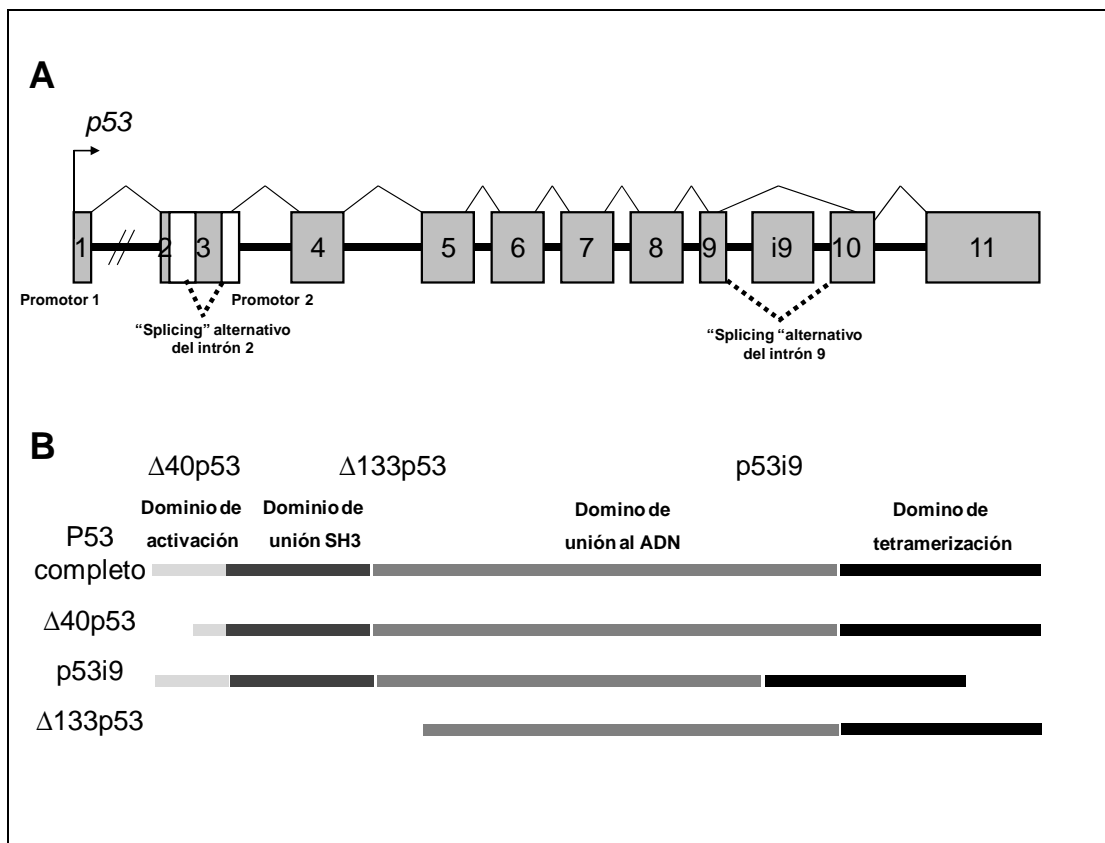


**Figura 11.** Estructura básica de la proteína p53. El péptido está constituido por 393 residuos de aminoácidos, el cual está dividido en la región amino-terminal, donde se incluye al dominio de activación y el de unión al SH3 (Src homolog 3), el "core" central donde se encuentra el dominio de unión al ADN y el carboxilo terminal, donde está ubicado el dominio de tetramerización. En verde se observan los sitios que son acetilados en la proteína. En amarillo se muestran los sitios fosforilables. En rojo se presenta al único residuo metilable.

#### 4.4- Las variantes proteicas de p53.

Como se comentó anteriormente, el gen *p53* humano contiene dos promotores, el primero transcribe a tres mensajeros distintos, los cuales codifican a la proteína de p53 completa, y a las isoformas p53i9 y  $\Delta 40$ p53 (Figura 12A y B; Bourdon et al., 2005). La proteína p53i9 está codificada por un corte y empalme

alternativo del intrón 9, presentando 60 residuos de aminoácidos truncados. Por otro lado la proteína  $\Delta 40p53$  (también conocida como p47 o  $\Delta Np53$ ; ver Figura 12B), tiene truncado los primeros residuos de aminoácidos del extremo amino-terminal. Esta proteína se forma a partir del corte y empalme alternativo del intrón 2 o por traducción o iniciación alternativa. Esta isoforma incorpora las mismas funciones que la proteína completa, pero su localización es estrictamente nuclear, además de no poder ser degradada por MDM2 (Ghosh et al., 2004).



**Figura 12.** Organización génica de *p53* humano. **A-** Esquema en donde se representan a sus dos promotores, a las regiones intrónicas y exónicas. **B-** Representación de las cuatro isoformas descritas para este gen (*p53* completa, a *p53i9* y  $\Delta 40p53$  y  $\Delta 133p53$  producido por el segundo promotor interno del intrón 4).

Recientemente se ha descrito un segundo promotor interno en el gen *p53* humano, el cual se encuentra dentro del intrón 4. El mensajero producido por este promotor interno codifica para tres variantes proteicas  $\Delta 133p53$  (35 kDa),  $\Delta 133p53\beta$  y  $\Delta 133p53\gamma$  (28 kDa) (Figura 12B). Estos péptidos presentan el dominio amino-terminal truncado al iniciar en el codón 133 (Bourdon et al., 2005). Las proteínas que se sintetizan no contienen el dominio de *trans*-activación y el dominio de prolinas, pero sí parte del dominio de unión al ADN. Por ensayos de expresión del mensajero se demostró que la variante  $\Delta 133p53\gamma$  se expresa en la mayoría de los tejidos normales con excepción de cerebro, corazón, pulmón, glándulas salivales intestino e hígado fetal (Bourdon et al., 2005). Por otro lado, la variante  $\Delta 133p53\beta$  se expresa en tejidos normales de colon, médula ósea, testículo, cerebro fetal e intestino (Bourdon et al., 2005). La localización celular de las variantes  $\Delta 133p53\beta$  y  $\Delta 133p53\gamma$  es citoplasmática, mientras que  $\Delta 133p53$  se observa mayoritariamente en el núcleo. Debido a que las isoformas  $\Delta 133p53\beta$  y  $\Delta 133p53\gamma$  muestran variaciones en 15 aminoácidos en el extremo carboxilo-terminal, se sugiere que dichas diferencias están involucradas en la localización celular del péptido (Bourdon et al., 2005). Todos estos datos sugieren una mayor complejidad tanto a nivel transcripcional, como traduccional del gen *p53* humano. De todo lo anterior se deduce que la expresión tejido específica de dichas isoformas puede estar relacionada con una actividad específica del péptido (Prives y Manfredi, 2005). Por lo cual, el descubrimiento de las distintas isoformas de *p53* nos hace pensar que la función de estos péptidos pueden tener actividad específicas en contextos celulares distintos, en donde la actividad celular de cada uno de los tejidos esté estrechamente relacionado con la isoforma en cuestión.

Todo lo anterior sugiere a su vez que la modulación de la expresión del gen es un factor clave en la regulación de la expresión en un tiempo espacio y tejido específico, y por lo tanto su des-regulación puede ser importante en el desarrollo de enfermedades como el cáncer. Cabe recalcar que la gran mayoría de los estudios realizados sobre p53 se han enfocado en las modificaciones post-traduccionales del péptido, dejando de lado a los elementos de control y por ende, su regulación a nivel transcripcional. Siendo así que hasta ahora se desconocen los mecanismos regulatorios a nivel epigenético que puedan estar modulando la expresión de éste gen.

## **5- ANTECEDENTES PARTICULARES.**

La regulación transcripcional de los genes no solo esta mediada por la unión de los factores transcripcionales a sus secuencias blancos, sino que también están involucrados los complejos proteicos que interaccionen con estos. En la actualidad se ha sugerido que la unión de un factor conocido como CTCF participa en la estructuración de una cromatina local permisiva a transcripción. Particularmente, este fenómeno se ha observado en regiones promotoras de genes asociados al ciclo celular de algunos genes supresores de tumores como *BRCA1*, *Rb* y *p16* entre otros.

### **5.1- El factor nuclear CTCF.**

El factor nuclear CCCTC, también conocido como CTCF es una proteína multifuncional de 11 dedos de zinc, la cual está conservada en muchos organismos. Inicialmente CTCF fue caracterizado tanto como un regulador positivo y como negativo de diferentes genes como *c-myc* y la apolipoproteína (Ohlsson et al., 2001). Posteriormente fue descrito como una proteína que participa en las diversas funciones que tienen los insulador, conocidos como elementos delimitadores de dominios, en la mayoría de los organismos estudiados. Recientemente se ha demostrado que CTCF juega un papel central en mediar las interacciones cromatínicas a distancia y en la dinámica nuclear (Burgess-Beusse et al., 2002; Recillas-Targa et al., 2002; Rubio et al., 2008; Phillips y Corces, 2009). En la actualidad existen evidencias que apoyan el papel de CTCF en el establecimiento y mantenimiento de la memoria epigenética como en el caso del locus improntado *IGF2/H19* (Su et al., 2008). Especialmente CTCF se ha visto



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

involucrado en múltiples aspectos de regulación epigenética como son la inactivación del cromosoma X, la impronta genómica, la regulación de transcritos no-codificantes, la estructura y función de elementos repetidos, entre otros (Wallace y Felsenfeld, 2007).

La ausencia de dicho factor a su vez ha sido vinculada con múltiples enfermedades como el síndrome Silver-Russell, el síndrome de Beckwith-Wiedemann y más recientemente con el desarrollo del cáncer (Aulmann et al., 2003; Butcher, et al., 2004; Butcher y Rodenhiser, 2007). En particular, CTCF participa en la regulación de genes involucrados en el control del ciclo celular como *BRCA1*, *Rb* y *p16* donde se ha observado una localización citoplasmática aberrante en el 77% de los carcinomas mamarios lo que correlaciona con la hipermetilación del ADN en el promotor del gen *BRCA1* (Butcher et al., 2004; Butcher y Rodenhiser, 2007; De la Rosa-Velazquez et al., 2007; Witcher y Emerson, 2009). Por lo tanto, es atractivo el considerar a CTCF como un buen candidato en la regulación de genes supresores de tumores, donde su mecanismo de acción probablemente ocurra a distintos niveles.

## **5.2- La regulación epigenética del promotor del gen *Rb* por el factor nuclear CTCF.**

Por otro lado y como un antecedente importante para este trabajo de tesis, en nuestro laboratorio descubrimos que CTCF regula al promotor de *Rb* humano. Mutaciones en la secuencia de unión al factor nuclear CTCF en el promotor del gen de *Rb* causa un rápido silenciamiento epigenético a través de la ganancia de metilación del ADN y la incorporación de la proteína de unión al ADN metilado

Kaiso (De La Rosa-Velázquez, et al., 2007). Esta es la primera evidencia que sugiere que el factor nuclear CTCF tiene la capacidad de proteger a una isla CpG (HCP) en contra de la metilación del ADN (De La Rosa-Velázquez, et al., 2007). A partir de estos datos surgieron nuevas interrogantes, como el conocer si el fenómeno de protección de CTCF es único en contra de promotores HPC o si un mecanismo similar ocurre en otro tipo de islas CpGs con una menor densidad de dinucleótidos CpGs como es el caso del promotor del gen *p53* humano.



## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

En la actualidad, se desconocen los mecanismos epigenéticos responsables de la regulación del promotor del gen *p53* humano. Consideramos que dilucidar estos procesos podría contribuir a entender uno de los mecanismos alternos para explicar la regulación e inactivación de la expresión del gen *p53* humano, tanto en células normales como en procesos carcinogénicos. Existen evidencias que sugieren que el factor nuclear CTCF pudiera ser el responsable de proveer estabilidad epigenética a promotores con una alta densidad de CpGs, donde su ausencia se asocia con la metilación del ADN. En la actualidad se desconoce si la ausencia de CTCF en islas CpGs intermedias o bajas, como en el caso del promotor del gen *p53* humano, desencadene un silenciamiento epigenético por diferentes procesos.

## **HIPÓTESIS.**

La regulación de la expresión del gen supresor de tumores *p53* humano puede estar modulada por factores epigenéticos. El factor nuclear CTCF tiene la capacidad de regular la actividad del promotor del gen *p53* humano, y la ausencia de este factor nuclear puede derivar en el silenciamiento epigenético del gen *p53*.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Identificar y caracterizar los procesos epigenéticos responsables de la regulación y des-regulación del promotor del gen *p53* humano y por lo tanto su

efecto en la expresión génica. A su vez, determinar el posible efecto regulador a nivel epigenético del factor nuclear CTCF sobre el promotor del gen *p53*.

### OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Caracterizar de los niveles de expresión y abundancia de la proteína del gen *p53* humano en distintas líneas celulares tumorales.
2. Analizar del estado de metilación del ADN en el promotor del gen *p53* en líneas celulares tumorales.
3. Caracterizar de la unión *in vitro* e *in vivo* del factor nuclear CTCF en la región 5' del promotor del gen *p53* humano.
4. Estudiar *in vivo* las modificaciones post-traduccionales en las histonas asociadas al promotor *p53* humano en distintas líneas celulares.

### Sistema celular empleado en el estudio.

Como criterio de selección del sistema experimental a utilizar, nos enfocamos en caracterizar el estado de expresión del gen *p53* reportado en distintas líneas celulares:

NOMBRE Num de acceso ATCC	ESTIRPE CELULAR	ESTADO DE EXPRESIÓN DE <i>p53</i>	Referencia
<b>SW480 (CCL-228)</b>	Adenocarcinoma colorrectal.	Expresión alta de <i>p53</i> .	Datos Experimentales Figura 13. <a href="http://www.atcc.org">www.atcc.org</a> .
<b>HeLa (CCL-2)</b>	Adenocarcinoma cervicouterino.	Expresión baja del gen <i>p53</i>	Datos Experimentales Figura 13.

			www.atcc.org.
<b>Kb (CCL-17)</b>	Carcinoma epidermal de boca.	Expresión de <i>p53</i> no descrita en la literatura	Datos Experimentales Figura 13.
<b>Fibroblastos</b>	Cultivo primario de fibroblastos humanos.	Expresión silvestre a <i>p53</i> (tejido normal).	Datos Experimentales Figura 13.
<b>T98G (CRL-1690)</b>	Glioblastoma multiforme	Sin expresión de <i>p53</i> ( <i>p53</i> mutado).	Amatya et al., 2005.
<b>U87MG (HTB-14)</b>	Glioma, astrocitoma grado III	Sin expresión de <i>p53</i> ( <i>p53</i> silvestre).	Amatya et al., 2005.

## **RESULTADOS.**

### **1- Caracterización de los niveles de expresión del gen *p53* humano y la abundancia de la proteína en distintas líneas celulares tumorales.**

En la actualidad se desconoce con exactitud los niveles de expresión del gen *p53* y su abundancia de su proteína en distintas líneas celulares tumorales. En particular, estamos interesados en determinar si existe alguna correlación entre la expresión del gen y los procesos epigenéticos que pudieran modular la actividad del promotor del gen *p53* humano.

Para ello, como primer abordaje se evaluaron mediante RT-PCR semicuantitativa los niveles de expresión del gen *p53* en diferentes líneas celulares de estirpe epitelial. En dicho análisis demostramos diferencias en la expresión de *p53*, en los distintos tipos celulares observando una mayor expresión de *p53* en la línea celular SW480, seguida por una menor expresión en células HeLa, identificando los niveles más bajos en las células Kb, con un nivel intermedio entre células HeLa y Kb, con respecto a la expresión observada en fibroblastos humanos considerados como células normales, no transformadas (Figura 13A). Como control de la reacción se evaluó la expresión del gen constitutivo *GAPDH*. A su vez, se determinó la abundancia y localización de la proteína *p53* en las mismas líneas celulares mediante ensayos de inmunofluorescencia. De manera consistente con los datos anteriores, y en comparación con los fibroblastos, la línea SW480 presentó la mayor abundancia de proteína *p53*, con una distribución a nivel nuclear, mientras que HeLa y Kb exhibieron una menor cantidad de proteína con una localización mayoritariamente citoplasmática (Figura 13B). Nuestros datos correlacionan con los resultados



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



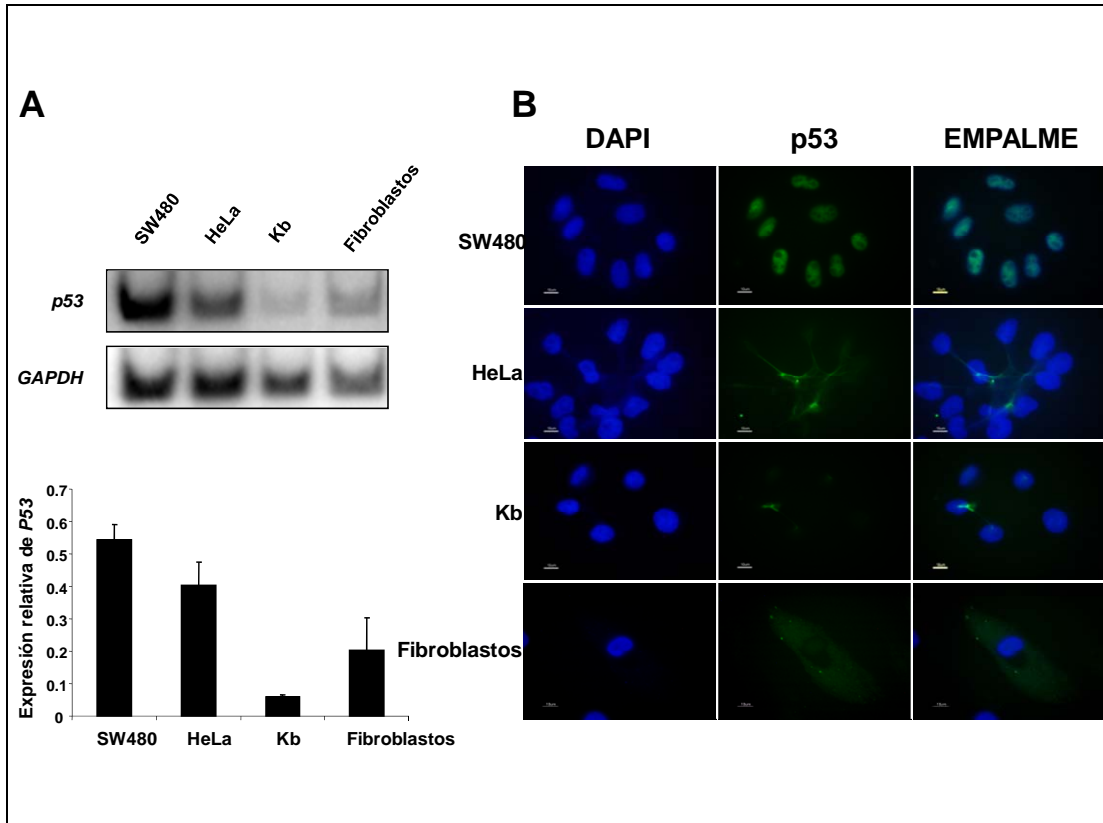
**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

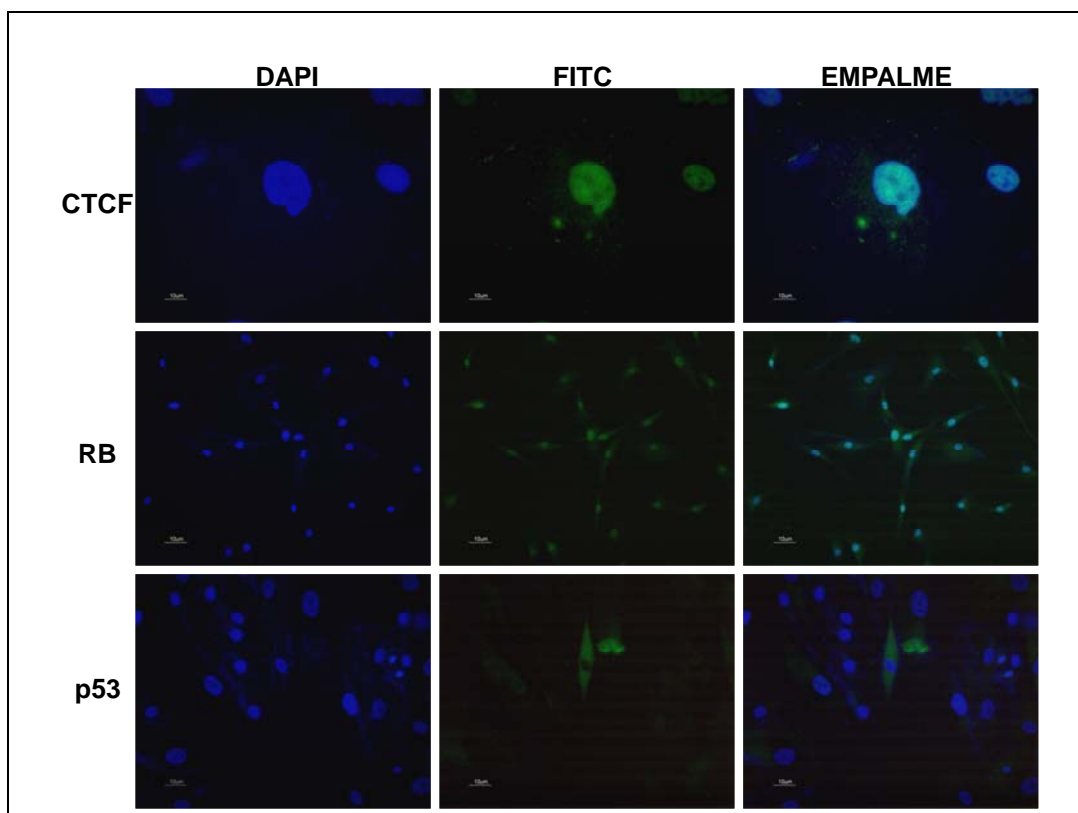
obtenidos de la expresión del gen, sugiriendo que el patrón de abundancia de la proteína p53 es regulado a nivel transcripcional (Figura 13A y B).



**Figura 13.** Determinación de la expresión y presencia de la proteína del gen *p53* humano en las líneas celulares SW480, HeLa y Kb. **A-** Evaluación de la expresión del gen *p53* humano mediante RT-PCR semicuantitativa. El producto para *p53* es de 300 pb, mientras que para *GAPDH* es de 127 pb. **B-** Localización y abundancia de la proteína *p53* evaluado mediante inmunofluorescencia. La barra corresponde a 10  $\mu$ m.

Estos datos demuestran a su vez, que en condiciones normales (cultivo primario de fibroblastos humanos) tanto la expresión del gen como la síntesis de la proteína de p53 se encuentran en niveles basales comparados con los observados en las líneas tumorales SW480 y HeLa (Figura 13A y B). Con el fin de corroborar dicho dato, comparamos la abundancia de otro tipo de proteínas como Rb y el

factor nuclear CTCF (Figura 14). Los datos muestran que tanto CTCF como Rb se localizan principalmente en el núcleo, siendo su concentración homogénea en todas las células. En péptido p53 se encuentra ausente en la mayoría de las células, y en los pocos casos donde se identifica una señal, su citolocalización es mayoritariamente citoplasmática (Figura 14).



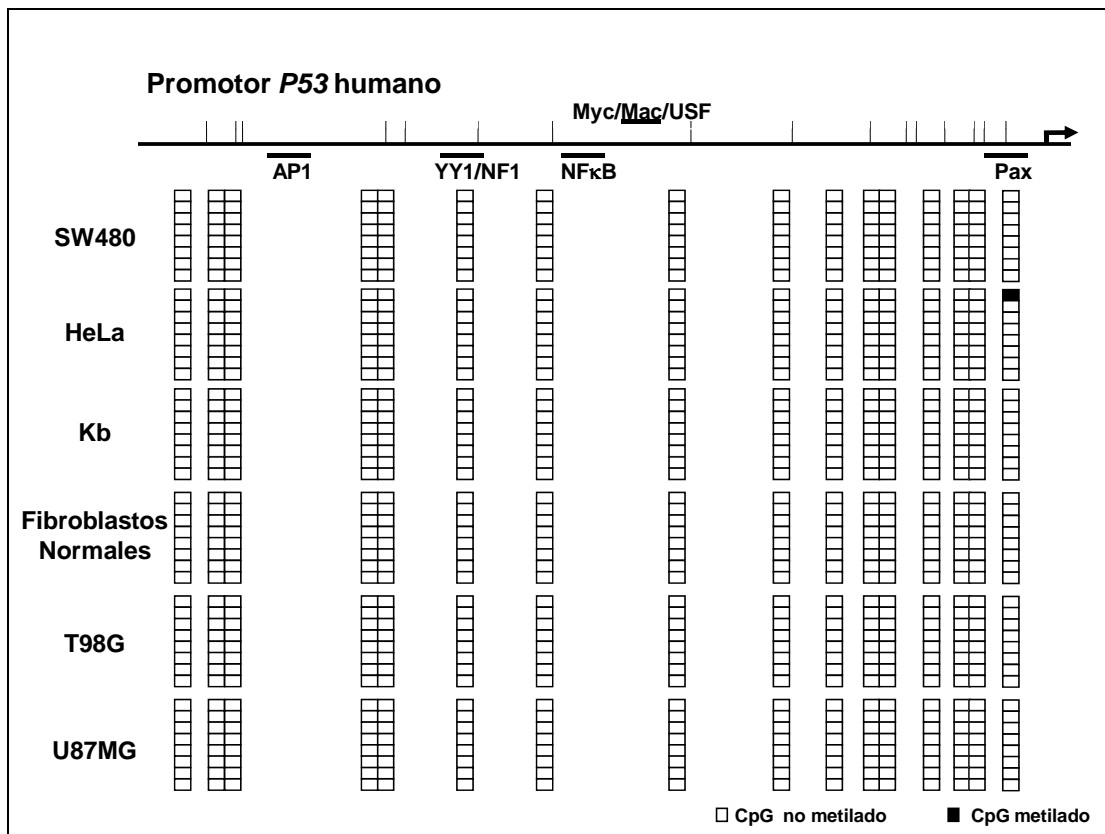
**Figura 14.** Determinación de la abundancia y distribución de las proteínas CTCF, Rb y p53 en células provenientes de un cultivo primario de fibroblastos humanos obtenido de prepucio neonatal. La tinción con DAPI se utilizó para evidenciar al ADN de doble cadena, el cual se localiza en el núcleo celular. La barra corresponde a 10  $\mu\text{m}$ .

## **2- Análisis del estado de metilación del ADN en el promotor del gen *p53* humano en líneas celulares tumorales.**

Con el fin de determinar si la metilación del ADN pudiera estar desempeñando un papel central en el silenciamiento de la expresión del gen *p53* humano, previamente determinado en las líneas celulares, se decidió utilizar la técnica de modificación por bisulfito de sodio, amplificación por PCR y secuenciación de un conjunto de clonas (Herman et al., 1996). Brevemente, esta técnica se basa en el tratamiento del ADN con bisulfito de sodio, que convierte a las citosinas no metiladas en uracilos, mientras las metiladas permanecen como tales. La modificación del ADN genómico permite por lo tanto diferenciar el estado metilado del no metilado. Posteriormente se realiza una reacción de PCR utilizando oligonucleótidos diseñados exclusivamente para reconocer a las secuencias modificadas. El producto de amplificación resultante de la reacción de PCR es clonado en un plásmido para posteriormente ser secuenciado, permitiendo así determinar su estado de metilación (Figura 15).

Los resultados demuestran claramente que el promotor del gen *p53* humano en las líneas celulares analizadas no se encuentra metilado, y que los distintos niveles de expresión observados por la RT-PCR no correlacionan con el estado de metilación del ADN del promotor del gen *p53* humano. Esto a su vez sugiere fuertemente que las modificaciones post-traduccionales de las histonas podrían ser las responsables de las variaciones de la expresión de dicho gen en distintos tipos celulares tumorales transformados.





**Figura 15.** Evaluación del estado de metilación por medio de la técnica de bisulfito de sodio y secuenciación en las líneas celulares SW480, HeLa, Kb, fibroblastos normales, y dos líneas de gliomas T98G y U87MG. Los cuadros vacíos representan a los CpGs no metilados, mientras que los cuadros negros corresponden a las CpGs metiladas. En este estudio se evaluaron a los 16 sitios CpGs (líneas verticales en el esquema superior del promotor del *p53*), presentes en el promotor del gen por medio de la secuenciación de al menos 8 clonas independientes.

### 3- Estudio *in vivo* de las modificaciones post-traduccionales en las histonas asociadas al promotor *p53* humano en distintas líneas celulares tumorales.

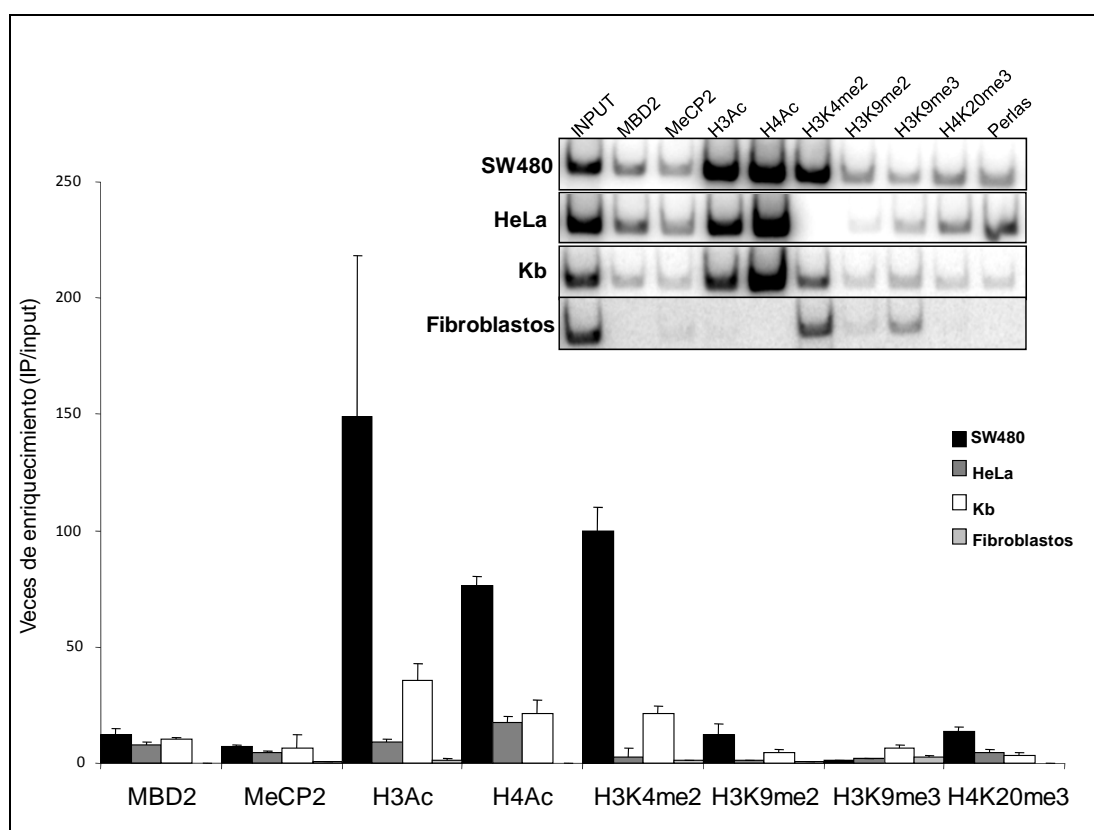
Con el fin de determinar si las marcas epigenéticas en las histonas son las responsables de modular la estructura de la cromatina, y por ende la expresión diferencial del gen *p53* humano en las líneas celulares bajo estudio, realizamos un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Con este ensayo evaluamos la presencia *in vivo* de proteínas y modificaciones post-traduccionales de histonas asociadas al promotor del gen *p53* humano en las líneas celulares que

presentan diferencias en sus niveles de expresión transcripcional. Además empleamos distintos anticuerpos que reconocen exclusivamente a proteínas de unión al ADN metilado como son MBD2 y MeCP2 (Patra et al., 2003). A su vez utilizamos anticuerpos que reconocen la dimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me2) marca asociada a promotores activos y a una cromatina laxa (Heintzman et al., 2007; Ruthenburg et al., 2007). Por otra parte se utilizaron anticuerpos que reconocen a las histonas H3K9me2, H3K9me3 y la H4K20me3, que corresponden a marcas en las histonas asociadas con una estructura de la cromatina cerrada (Fahrner et al., 2002; Nguyen et al., 2002; Ebert et al., 2006;). Los datos fueron normalizados mediante una PCR-dúplex, utilizando dos pares de oligonucleótidos sintéticos: el primer par corresponde a la secuencia del promotor *p53* humano y el segundo a un intrón del gen *MyoD* con la finalidad de normalizar los datos obtenidos y realizar una cuantificación de la abundancia relativa de cada inmunoprecipitación (Sawado et al., 2001).

### **3.1 Inmunoprecipitación de cromatina en las líneas celulares tumorales.**

El resultado del ChIP muestra principalmente un enriquecimiento de las histonas H3 y H4 poli-acetiladas en el promotor de *p53* en la línea celular SW480, a su vez se observa un abundante enriquecimiento de la H3K4me2 (Figura 16). Estos resultados sugieren que la región promotora de *p53* en esta línea celular en particular se encuentra mayoritariamente en una estructura de la cromatina abierta, resultado que concuerda tanto con los niveles de expresión como con la abundancia de la proteína evidenciada para esta línea celular (Figura 13A y B). Por su parte, las líneas celulares HeLa y Kb presentan una disminución en la

abundancia de marcas en las histonas asociadas a una cromatina abierta, lo cual apunta a que la acetilación de las histonas H3 y H4 como la H3K4me2 son modificaciones de las histonas relacionadas con la activación a nivel epigenético del promotor del gen *p53* humano. Consistente con nuestros análisis de la metilación del ADN, no logramos observar un enriquecimiento en las proteínas de unión al ADN metilado como MBD2 y MeCP2, lo cual confirma el hecho de que los promotores no están metilados en las distintas líneas celulares (Figura 14 y 15). En conjunto nuestros resultados apuntan a que las modificaciones covalentes de las histonas participan a nivel epigenético en la regulación de la expresión del gen *p53* humano.



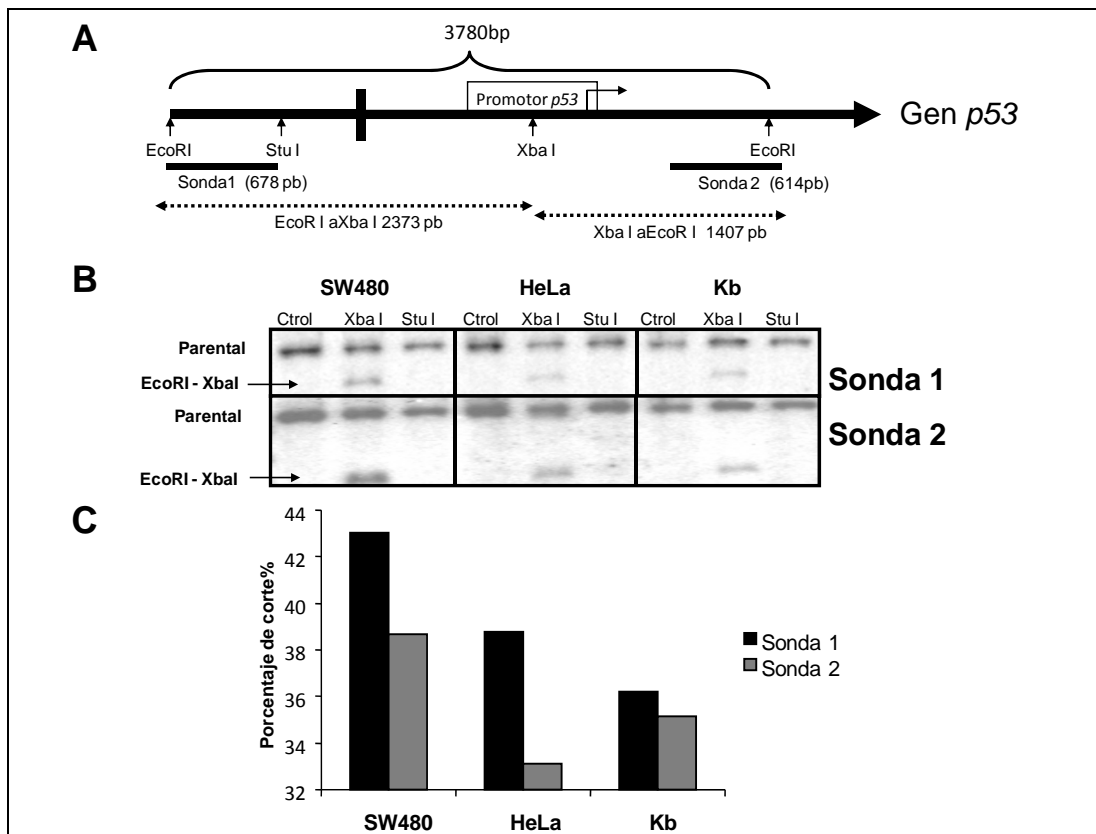
**Figura 16.** Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) del promotor del gen *p53* en las líneas celulares SW480, HeLa, Kb y Fibroblastos humanos donde se evaluaron distintas marcas de modificaciones post-traduccionales de las histonas y proteínas de unión al ADN metilado. Los

resultados se presentan en veces de enriquecimiento con respecto al “input”, y los valores promedio se obtuvieron a partir de dos inmunoprecipitaciones independientes.

### **3.2 Evaluación del estado de estructuración de la cromatina en las distintas**

#### **líneas celulares.**

Con el fin de determinar *in situ* el estado de estructuración de la cromatina presente en el promotor del gen *p53* humano de las distintas líneas celulares analizadas, decidimos utilizar el ensayo de accesibilidad a enzimas de restricción (Escamilla-Del-Arenal y Recillas-Targa, 2008). Dicho ensayo se basa en un tratamiento *in situ* de núcleos aislados de las distintas estirpes celulares con enzimas de restricción. La accesibilidad de dicha enzima a su sitio de corte dependerá del grado de estructuración de la cromatina. La interpretación de este ensayo se basa que a mayor accesibilidad, mayor corte, y su evaluación se realiza mediante la técnica de Southern blot, con la cual se puede estimar el porcentaje de corte realizado por dicha enzima *in situ* al interior del núcleo (Figura 17C). Para dicho ensayo se analizó la secuencia nucleotídica de la región 5' no-codificante del gen *p53* con el fin de determinar qué enzimas presentan secuencias de corte en el promotor, en particular aquellas con un solo sitio de corte, determinando que la enzima XbaI era la adecuada para este estudio (Figura 17A). Posteriormente se realizó un ensayo de Southern blot con el objetivo de estimar la accesibilidad y corte de dicha enzima (Figura 17B), para poder determinar el porcentaje de corte (Figura 17C).



**Figura 17.** Análisis del estado de estructuración de la cromatina mediante la técnica de accesibilidad a enzimas de restricción *in situ* determinado en las líneas celulares SW480, HeLa y Kb. **A-** Esquema representativo de la región promotora del gen *p53* humano con la localización de las enzimas utilizadas EcoRI, StuI y XbaI (misma que tiene un único corte en el promotor del gen *p53* humano). **B-** Ensayos de Southern blot para demostrar la accesibilidad a enzimas de restricción donde se evaluaron dos sondas. Las bandas que se observa corresponden a la parental y a la enzima presente sobre el promotor del gen. **C-** Cuantificación de las accesibilidades a enzimas de restricción *in situ*.

Al realizar dicho ensayo observamos que la enzima de restricción XbaI tiene mayor frecuencia de corte *in situ* en núcleos aislados de la línea celular SW480 mientras que se aprecia una disminución gradual de la sensibilidad al corte por la enzima en núcleos de las líneas celulares HeLa y Kb (Figura 17C). Estos resultados fueron similares al utilizar dos sondas distintas que revelan el costado 5' y 3' del promotor, respectivamente. Dichos resultados son congruentes con los obtenidos por ChIP (Figura 4), en los cuales se sugiere que SW480 posee

una mayor abundancia de marcas en las histonas asociadas a una cromatina más laxa lo cual repercute en niveles elevados de expresión del gen *p53* en comparación con las demás líneas celulares tumorales estudiadas.

En resumen, los datos de accesibilidad a enzimas de restricción confirman *in situ* cambios en la conformación de la cromatina, dependientes de modificaciones covalentes de las histonas como acetilación de las histonas H3 y H4 y la dimetilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me2). Como se ha mencionado, estos resultados concuerdan con los niveles transcripción del gen *p53* humano en cada uno de los contextos celulares. De igual forma nuestros datos sugieren que el estado basal de expresión del gen *p53* es bajo en fibroblastos en comparación con otros tipos de células transformadas. Donde el promotor del gen presenta una conformación de una cromatina mayoritariamente cerrada.

Estos resultados nos indican la participación de algún elemento que pudiera evitar que el promotor del gen sea silenciado y que a su vez este fungiera como marca de memoria para inducir rápidamente y de manera regulada su activación en respuesta a estímulos específicos. Datos del laboratorio demuestran que el factor nuclear CTCF presente en el promotor del gen supresor de tumores *Rb* participa en el mantenimiento de la integridad de la cromatina, manteniendo así libre de metilación del ADN al promotor del gen (De La Rosa-Velázquez et al., 2007). Con estos antecedentes decidimos plantear la hipótesis en la cual se sugiere que CTCF participa en la regulación del promotor del gen *p53* humano.

#### **4- Unión del factor nuclear CTCF *in vitro* e *in vivo* en la región 5' del promotor del gen supresor de tumores *p53* humano.**

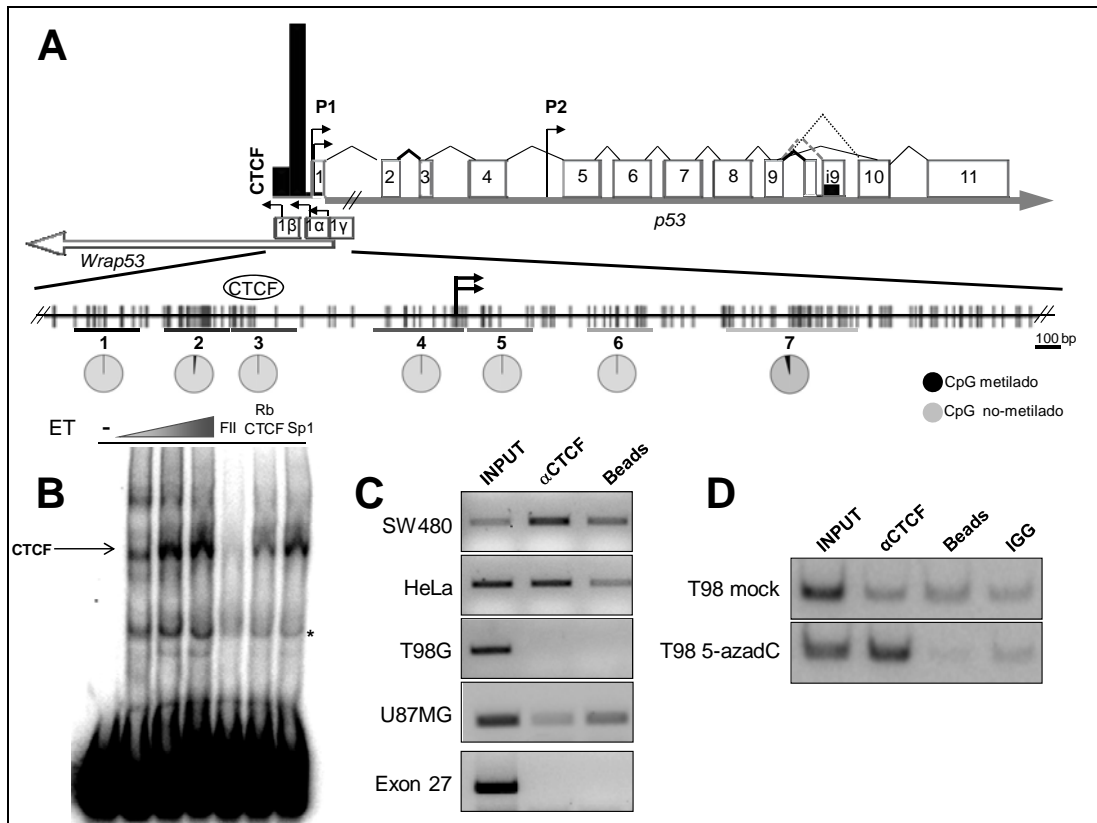
##### **4.1 La unión *in vitro* de CTCF.**

Con el fin de investigar la posible participación del factor nuclear CTCF en el control transcripcional del gen supresor de tumores *p53* humano, realizamos un análisis *in silico* a lo largo de ~3 kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Logramos identificar un sitio potencial de unión a CTCF ~1 kb cercano a una isla CpG, río arriba del promotor del gen (Figura 18A). Debido a que CTCF no posee una secuencia consenso de unión bien definida se utilizó como criterio de búsqueda el motivo 5'-CTAG-3' presente en la secuencia del insulador  $\beta$ -globina de pollo (cHS4-FII a la cual llamaremos como FII), que tiene la capacidad de unir al factor CTCF (Farrell et al., 2002; Valadez-Graham et al., 2004). Una vez ubicada la secuencia de unión a CTCF, se procedió a demostrar si CTCF tenía la capacidad de unirse *in vitro* a dicha secuencia. Para ello, se generó una sonda por medio de PCR de 78 pb (*p53*-CTCF) la cual fue marcada radioactivamente para posteriormente ser utilizada en ensayos de movilidad electroforética retardada (o EMSA por sus siglas en inglés). La sonda marcada fue incubada con extractos totales de células HeLa con concentraciones crecientes, con lo cual se logró observar la formación de un complejo dependiente de las cantidades de extractos proteicos utilizado (Figura 18B). Con el fin de demostrar si efectivamente el complejo formado por la sonda se trataba de CTCF se realizaron competiciones utilizando a las sondas no marcadas radioactivamente (o sonda fría) correspondiente a la secuencia FII y como control adicional el del sitio de unión de

CTCF en el promotor de *Rb*. Con ello se logró competir de manera específica con sondas frías que reclutan a CTCF como FII y Rb-CTCF utilizando la concentración mayor de extractos proteicos (Figura 18B, carril 5 y 6), como control negativo del ensayo se utilizó una sonda fría irrelevante que reconoce al factor transcripcional Sp1, donde no se observó competición alguna (Figura 18B carril 7). Estos datos sugieren que CTCF se une *in vitro* a estas secuencias.

Para determinar la unión *in vivo* de CTCF a la región 5' del promotor del gen *p53* humano se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina en distintas líneas celulares (Figura 18C). Interesantemente, aquellas líneas celulares que expresan a *p53* como SW480 y HeLa unen a CTCF *in vivo* (Figura 13 y 18C), mientras que las líneas celulares derivadas de gliomas como T98G y U87MG, las cuales no expresan al gen *p53* humano, no presentaron la unión de CTCF. Este dato sugiere fuertemente que la unión de CTCF puede tener una relación con el mantenimiento de la expresión del gen *p53* humano (Figura 18C). La unión *in vivo* fue confirmada por reportes posteriores de la literatura, donde por medio de ensayos de ChIP y secuenciación (ChIP-seq) se ratificó la asociación de CTCF en la región 5' del promotor del gen *p53* humano (Barski et al., 2007; <http://dir.nhlbi.nih.gov/papers/lmi/epigenomes/hgtcell.aspx>; Su et al., 2008; Figura 18A). De manera interesante, cuando repetimos el ensayo de ChIP en células T98G tratadas con 5-azadC observamos la reincorporación del factor nuclear CTCF (Figura 18D).

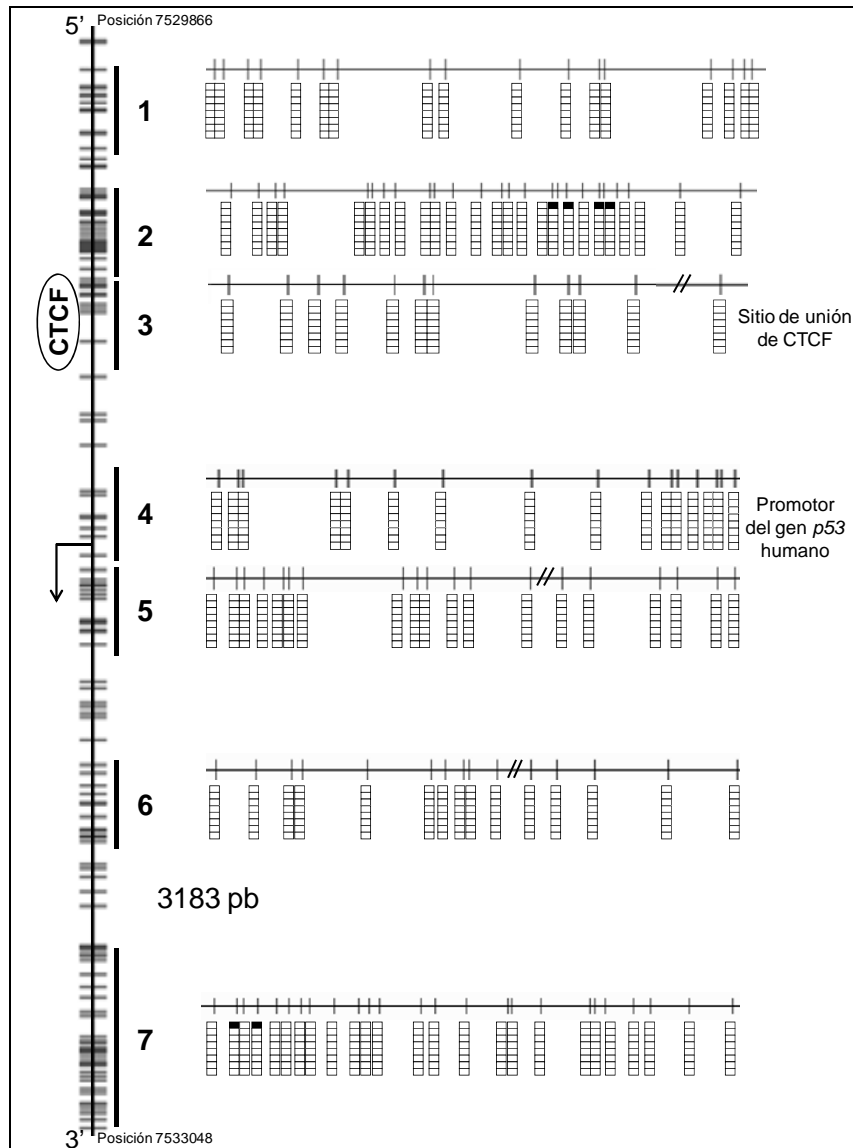




**Figura 18.** Unión *in vitro* e *in vivo* de CTCF en la región 5' del promotor del gen *p53* humano y la caracterización del metiloma del dominio *p53-Wrap53*. **A-** Representación esquemática del dominio génico de *p53-Wrap53* donde se muestra la posición de los promotores, exones y la densidad de CpG (representados por líneas verticales). La unión *in vivo* de CTCF reportada por UCSC Genome Browser es representada en barras verticales negras. P1 simboliza al promotor principal de *p53* humano y P2 a un promotor alternativo. Debajo de este se muestra un esquema detallado de la organización genómica de ~3 kb que abarca río arriba de la región regulatoria y el primer intrón del gen *p53*. Dentro de este mismo esquema se muestra en graficas de pastel el análisis de metilación del ADN realizado por bisulfito de sodio y secuenciación, para ello se analizaron 7 zonas de 300 pb aproximadamente **B-** Ensayo de movilidad electroforética retardada utilizando una sonda de 78 pb (Carriles 1 sonda libre, 2,3 y 4 cantidades crecientes de extracto proteico total de células HeLa, 4 y 5 competencias con sondas frías FII, Rb-CTCF (reportadas que reconocen la unión a CTCF) y Sp1 como control negativo. El asterisco define un complejo retardado no específico. **C-** Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) del sitio de unión a CTCF en la región 5' del promotor del gen *p53* humano en distintas líneas celulares tumorales, incluidas dos líneas celulares de gliomas. Como control negativo se empleó oligonucleótidos del exón 27 del gen de *Rb* (De La Rosa-Velázquez, et al., 2007). **D-** Ensayo de ChIP sobre la línea celular T98G, no tratada (T98G mock) y tratada con 5-azadC. Se determinó el rango lineal de amplificación utilizando material del Input, a su vez se incluyó como control negativo a las perlas y anti-IgG.

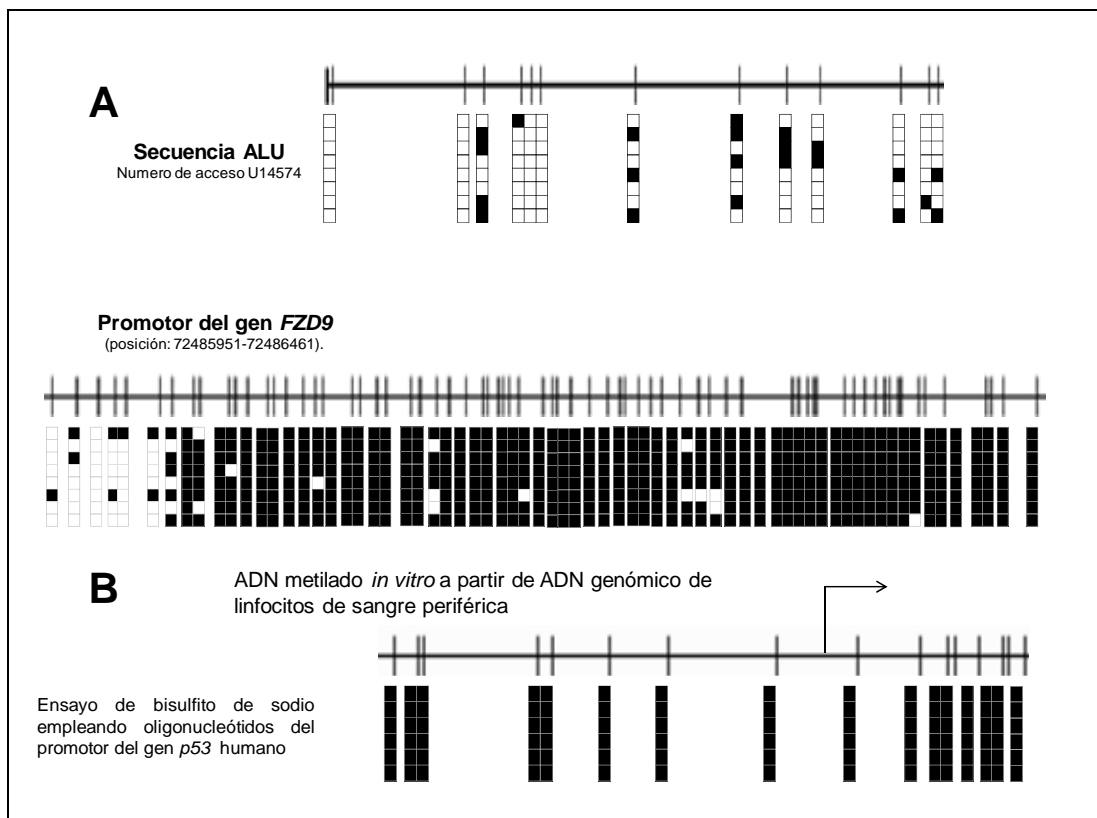
Basados tanto en los antecedentes como en nuestros resultados decidimos evaluar extensivamente el estado de metilación del ADN en la línea celular T98G, comprendiendo una región de 3.18 kb. Dicho estudio se llevó a cabo mediante el

ensayo de bisulfito de sodio, PCR y secuenciación, abarcando 7 fragmentos genómicos que incluyen una región 5' al sitio de unión de CTCF hasta el intrón 1 del gen *p53* (posición 7529866- 7533048) (ver Figura 18A y Figura 19).



**Figura 19.** Análisis de metilación del ADN por bisulfito de sodio y secuenciación de la línea celular T98G en el promotor del gen *p53* humano, el sitio de unión a CTCF y secuencias genómicas adyacentes. Se analizaron 8 clonas independientes de cada uno de los sub-fragmentos de ADN genómicos analizados (sitios 1 al 7). El resumen de los datos se muestran en gráficas de pastel en la Figura 18A.

Como control se caracterizó el estado de metilación del ADN de dos secuencias genómicas no relacionadas (Kang et al., 2001; Brown et al., 2007; Martinez et al., 2009). En dicho análisis se observó la presencia de metilación del ADN sobre un fragmento genómico correspondiente a una secuencia repetida *Alu*, y una hipermetilación del ADN de la región río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *FZD9* (Figura 20 A). A su vez, se evaluó el estado de metilación del ADN del promotor del gen *p53* humano sobre ADN genómico metilado *in vitro* (Figura 20 B).



**Figura 20.** Controles positivos de metilación del ADN evaluado por bisulfito de sodio y secuenciación. **A-** Un fragmento de secuencia repetida *Alu* y 500 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen *FZD9* fueron analizados por bisulfito de sodio y secuenciación. **B-** Metilación *in vitro* del ADN por medio de la metilasa *SssI* sobre linfocitos de sangre periférica de un individuo sano, y análisis del estado de metilación del ADN del promotor del gen *p53* humano. De 5 a 8 clonas independientes fueron analizadas de cada gen.

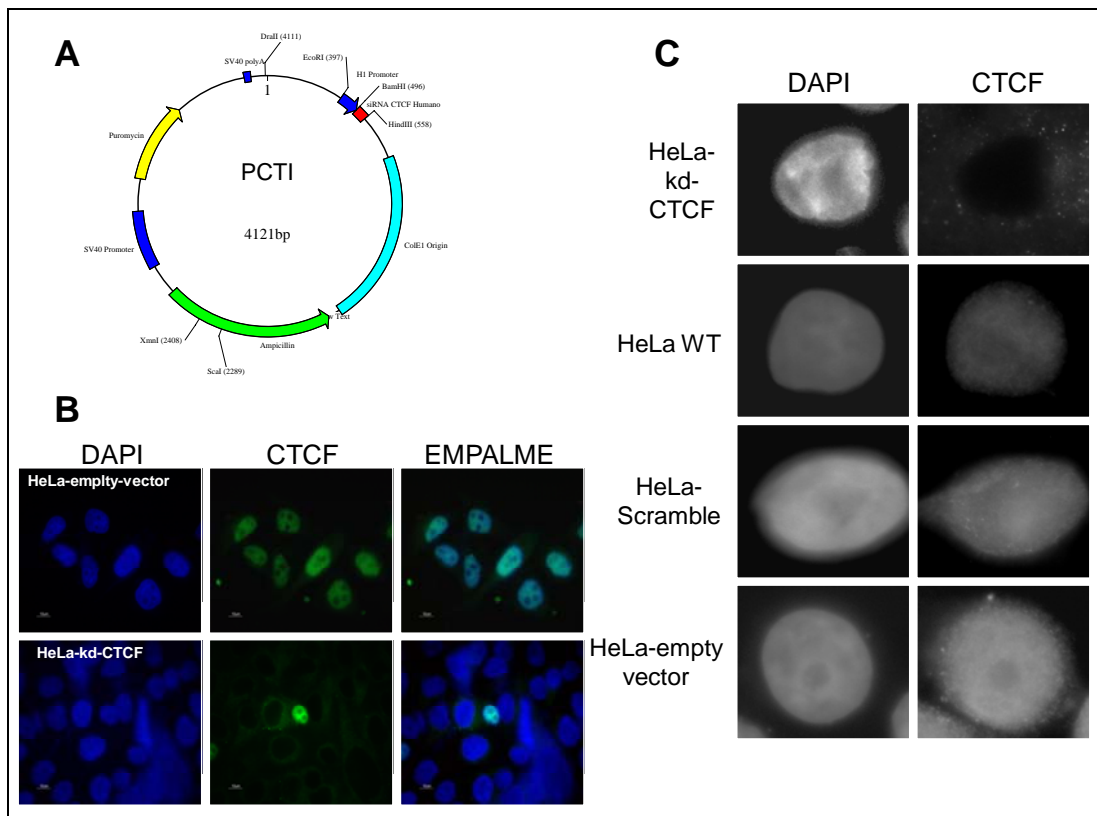
No logramos detectar metilación del ADN en el glioma T98G sobre una región genómica de 3.18 kb; esto sugiere que la disociación a nivel local de CTCF en la región cercana al promotor del gen *p53* humano en células provenientes de gliomas no es dependiente de metilación del ADN. Por otro lado, datos en la literatura sugieren que el silenciamiento génico mediado por metilación del ADN no comienza en sus promotores o en las islas CpGs. Actualmente se ha propuesto que la metilación del ADN inicia en los extremos de las islas CpGs, afectando directamente la expresión génica (Irizarry et al., 2009). Estos antecedentes nos hacen especular que posiblemente la metilación del ADN pueda encontrarse en regiones más alejadas o inclusive que su efecto se da de manera indirecta.

En resumen, hemos descubierto un nuevo sitio de unión a CTCF el cual se une al promotor de *p53* únicamente en aquellas líneas celulares que expresan al gen *p53*. Estos datos apoyan la idea de que la unión de CTCF es relevante para la estabilidad del promotor del gen *p53* y una configuración óptima de la región a nivel epigenético (Figura 18).

## **5- Contribución funcional del factor nuclear CTCF sobre la actividad del promotor del gen *p53* humano.**

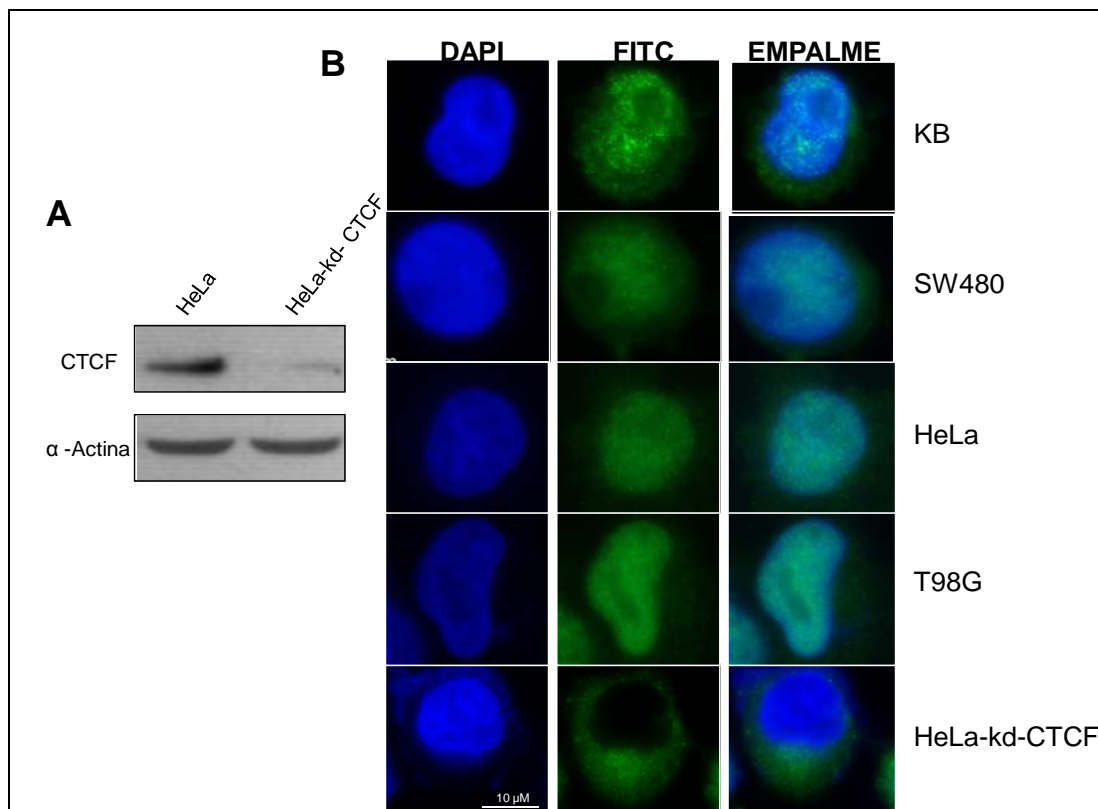
Una vez obtenidos estos resultados, nos preguntamos ¿cuál puede ser la contribución funcional de CTCF en la regulación del gen *p53* humano? Para abordar esta pregunta, decidimos generar una línea celular estable deficiente a CTCF (HeLa-kd-CTCF) por medio de la sobre-expresión de un vector que contiene a un RNA interferente tipo tallo-asa (shRNA) en contra del CTCF humano (pCT1;

ver Figura 21A) donado por el Dr. Ishihara (Ishihara et al., 2006). Por medio de inmunofluorescencia se observa que la línea celular HeLa-kd-CTCF abate notoriamente los niveles del péptido en la mayoría de las células (Figura 21B). Como control del ensayo, se establecieron líneas celulares que contienen por un lado al vector vacío (pSilencer 3.1 H1-puro) a la cual llamaremos HeLa-empty-vector y otro vector que contiene a la secuencia del RNA interferente de CTCF con una secuencia organizada al azar (HeLa-Scramble; Figura 21C).



**Figura 21.** Establecimiento de línea celular deficiente a CTCF (HeLa-kd-CTCF) mediante la sobre-expresión de un RNA interferente tipo tallo-asa (shRNA) se llevó a cabo la caracterización de CTCF en distintas líneas celulares. **A-** Esquema del vector que contiene a un RNA interferente tipo tallo-asa en contra de CTCF (pCT1). **B-** Caracterización por medio de inmunofluorescencia de la abundancia de CTCF en la línea celular HeLa-empty-vector y HeLa deficiente a CTCF (HeLa-kd-CTCF). **C-** Evaluación de CTCF por medio de inmunofluorescencia de la HeLa-kd-CTCF vs controles (HeLa, HeLa-Scramble y HeLa-empty-vector).

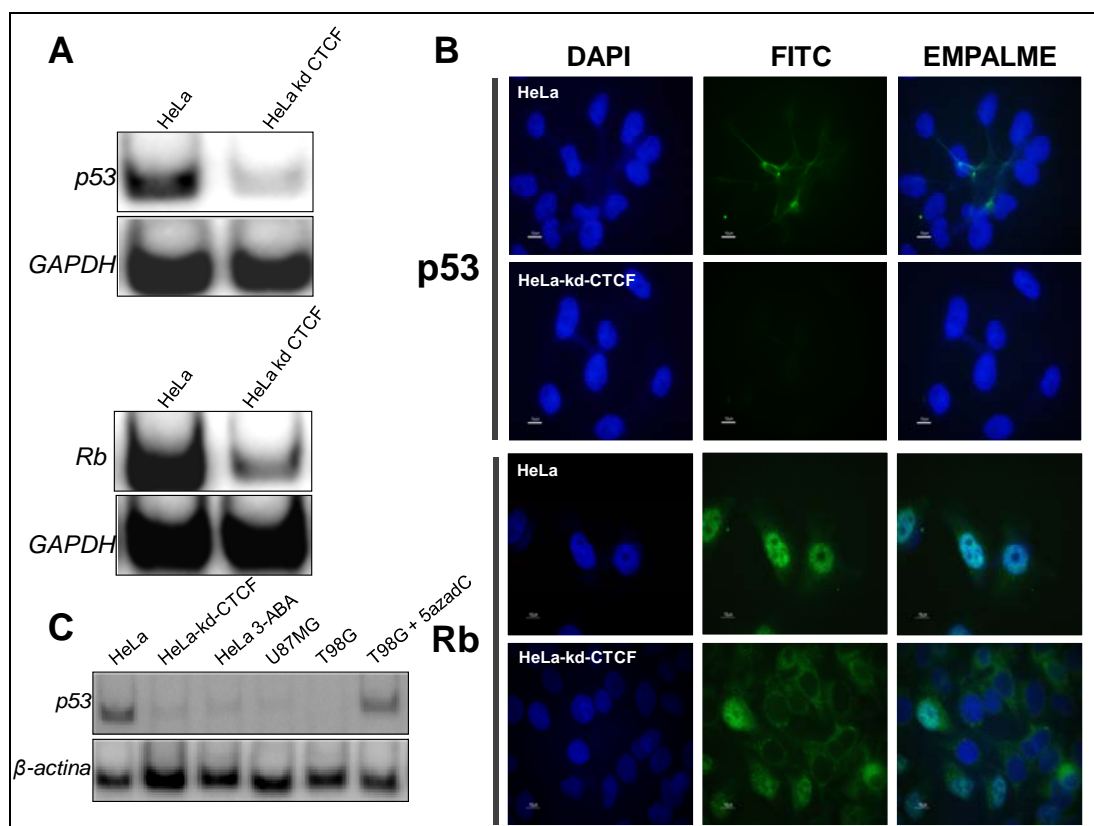
A su vez, por medio de Western blot, corroboramos la reducción en los niveles proteicos de CTCF (Figura 22A). De igual forma, por medio de inmunofluorescencia evaluamos la citolocalización de CTCF en distintas líneas celulares incluyendo a HeLa-kd-CTCF (Figure 22B). De manera interesante, todas las líneas celulares presentan enriquecimiento de CTCF a nivel nuclear, incluyendo a la línea celular proveniente de glioma T98G (Figura 22B, panel inferior). Este dato confirma de manera indirecta que la ausencia de CTCF en la región 5' del promotor de *p53* en las líneas celulares de gliomas es un evento local que correlaciona con el silenciamiento en la expresión del gen (Figura 18C y 22B).



**Figura 22.** Caracterización y comparación de línea celular deficiente a CTCF (HeLa-kd-CTCF) vs distintas líneas celulares tumorales. **A-** Evaluación por medio de Western blot de la abundancia de CTCF en la línea celular HeLa silvestre y HeLa deficiente a CTCF (HeLa-kd-CTCF). **B-**

Inmunocitocalización de CTCF en diferentes líneas celulares, incluida a HeLa-kd-CTCF. La barra de aumento corresponde a 10  $\mu$ M.

Ensayos *in vitro* realizados en nuestro laboratorio han sugerido que la falta de unión de CTCF al promotor del gen supresor de tumores *Rb* promueve un silenciamiento epigenético del gen (De La Rosa-Velázquez et. al. 2007). Por ello, una vez establecida la línea celular HeLa-kd-CTCF, nos avocamos en determinar el papel funcional de CTCF sobre los promotores *p53* y *Rb*, comparando en las líneas celulares HeLa y HeLa-kd-CTCF. Evaluamos la expresión de ambos genes mediante RT-PCR semi-cuantitativa tanto en células HeLa como en células HeLa-kd-CTCF (Figura 23A).



**Figura 23.** Contribución funcional de CTCF en la actividad de los promotores de genes supresores de tumores *p53* y *Rb*. **A-** Evaluación de la expresión mediante RT-PCR semi-cuantitativa de los genes *p53* y *Rb* en la línea celular HeLa y HeLa deficiente a CTCF (HeLa-kd-CTCF). **B-** Inmunofluorescencia de *p53* y *Rb* en HeLa-kd-CTCF. Se utilizó el anticuerpo secundario de

fluoresceína (FITC) para evidenciar tanto a p53 como Rb. **C-** Comparación de la abundancia relativa de la expresión de *p53* en diferentes líneas celulares incluyendo a células tratadas con el inhibidor de la metilación del ADN (5-azadC) y de la poli(ADP-ribosil)ación, el 3-aminobenzamida (3-ABA) a una concentración de 8 mM por 48 horas. En este experimento se utilizó oligonucleótidos para evaluar la expresión gen de de *β-actina* como control de carga.

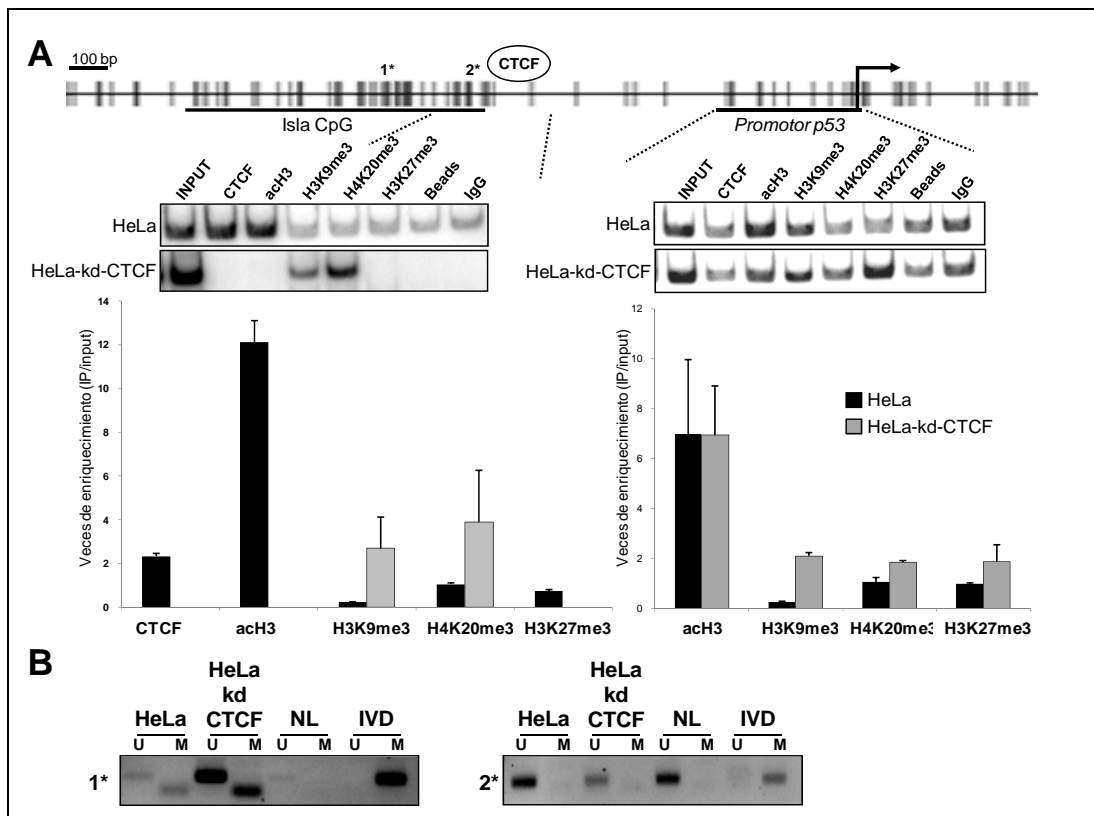
Los resultados mostraron una disminución significativa de la expresión de ambos genes supresores de tumores en la línea HeLa-kd-CTCF en comparación con las células HeLa-control. Estos datos apoyan el papel de CTCF en el mantenimiento de la expresión de estos genes (Figura 23A; ver discusión). A su vez, por medio de ensayos de inmunofluorescencia, evaluamos la abundancia de las proteínas p53 y Rb en ausencia de CTCF y observamos la pérdida de la proteína de p53 (Figura 23B), mientras que para Rb se observó una disminución significativa a pesar de ello, algunas células que aún presentan a la proteína. Este dato podría explicarse debido a que la proteína de p53 es más lábil, dado que su vida media es de 20 minutos, mientras que el péptido de Rb es más estable, por lo cual, el transcrito remanente permite evidenciar algo de proteína en sus células (Figura 23B). Esta hipótesis es congruente con los datos obtenidos en fibroblastos, donde se percibe una distribución más homogénea de Rb a nivel celular (Figura 14).

Los datos obtenidos apuntan a que el factor nuclear CTCF pudiera desempeñar un papel central en la estabilidad de los promotores de los genes supresores de tumores *p53* y *Rb*. Con base a lo anterior, nos preguntamos si existían diferencias en las marcas covalentes de las histonas que pudieran asociarse con el silenciamiento del promotor del gen *p53* humano.



## **6- Perturbación local de la estructura de la cromatina en células deficientes a CTCF.**

Nuestros datos apuntan a que la unión de CTCF ~1 kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del promotor del gen *p53*, es importante para la expresión normal del gen, donde su disociación se asocia con el silenciamiento del gen. Con todos estos antecedentes deseamos determinar si las marcas covalentes de las histonas y la metilación del ADN pueden estar relacionadas con la inactivación del promotor. Para ello mediante ensayos de ChIP analizamos la unión *in vivo* de CTCF y la presencia de distintas marcas en las histonas como, la acetilación de la histona H3 (acH3) y a las marcas represoras H3K9me3, H3K20me3 y H3K27me3 (Figura 24A). Dicho ensayo se llevó a cabo tanto para el sitio de unión a CTCF como para el promotor del gen *p53* humano utilizando a las líneas celulares HeLa y HeLa-kd-CTCF (Figura 24).



**Figura 24.** Consecuencias epigenéticas de la ausencia de CTCF sobre su sitio de unión y en la región del promotor del gen *p53*. **A-** CHIP comparativo utilizando distintos anticuerpos que reconocen marcas asociadas tanto apertura como cierre de la cromatina. Dicho ensayo se realizó sobre células HeLa y HeLa deficientes a CTCF. 3K27me3 se encuentra enriquecida exclusivamente sobre el “core” del promotor del gen *p53*.

**B-** Ensayo de PCR sensible a metilación (MS-PCR) hecho sobre las células HeLa y HeLa-kd-CTCF. Con este ensayo se evaluaron 2 zonas pertenecientes a la isla CpG de la región 5' del promotor del gen (esquema en A; uno distal (1\*) y un segundo (2\*) que sobrelapa al sitio de unión de CTCF). Como control se utilizó ADN convertido por bisulfito de sodio obtenido de linfocitos de sangre periférica normal y de ADN metilado *in vitro* por medio de la metilasa *SssI* (IVD). U representa al producto de amplificación del templado no metilado y M representa a la amplificación del producto del templado metilado.

Determinamos que la pérdida de la unión de CTCF a su sitio blanco en el promotor del gen *p53* humano fomenta el enriquecimiento de las marcas de histonas H3K9me3 y H4K20me4 y una disminución dramática de la acH3 en las células HeLa-kd-CTCF (Figura 24A). Interesantemente cuando analizamos a la región del promotor del gen *p53* no logramos observar cambios importantes en los niveles de la acetilación de histonas, pero si en cuanto a la ganancia de

marcas represivas en las histonas tales como H3K9me3, H4K20me3 y H3K27me3 (Figura 24A). Es llamativo el hecho que únicamente logramos determinar el enriquecimiento de la marca represiva en la histona H3K27me3 sobre la región promotora del gen cercana al sitio de inicio de la transcripción en células deficientes a CTCF. Estos datos sugieren que las fuentes de silenciamiento epigenético que se observan tanto en el sitio de unión a CTCF como en el promotor del gen son distintas y deben ser reclutadas posiblemente por mecanismos distintos. Estas diferencias ponen en evidencia una organización genómica del gen *p53* en subdominios, donde el promotor de *p53* en condiciones aberrantes puede reclutar a miembros de la familia de proteínas represoras Polycomb y el establecimiento de la marca covalente de la histona H3K27me3 (ver discusión).

Para complementar este estudio, decidimos analizar el estado de metilación del sitio de unión a CTCF mediante amplificaciones por PCRs sensibles a metilación (MS-PCR). Para llevar a cabo esta técnica, se procedió a convertir el ADN genómico mediante un tratamiento con bisulfito de sodio. Posteriormente se diseñaron oligonucleótidos que tienen la capacidad de reconocer exclusivamente secuencias tanto no metiladas (U), como las metiladas (M) (Figura 24B). Por medio de este ensayo logramos evidenciar una vez más la ausencia de metilación del ADN.

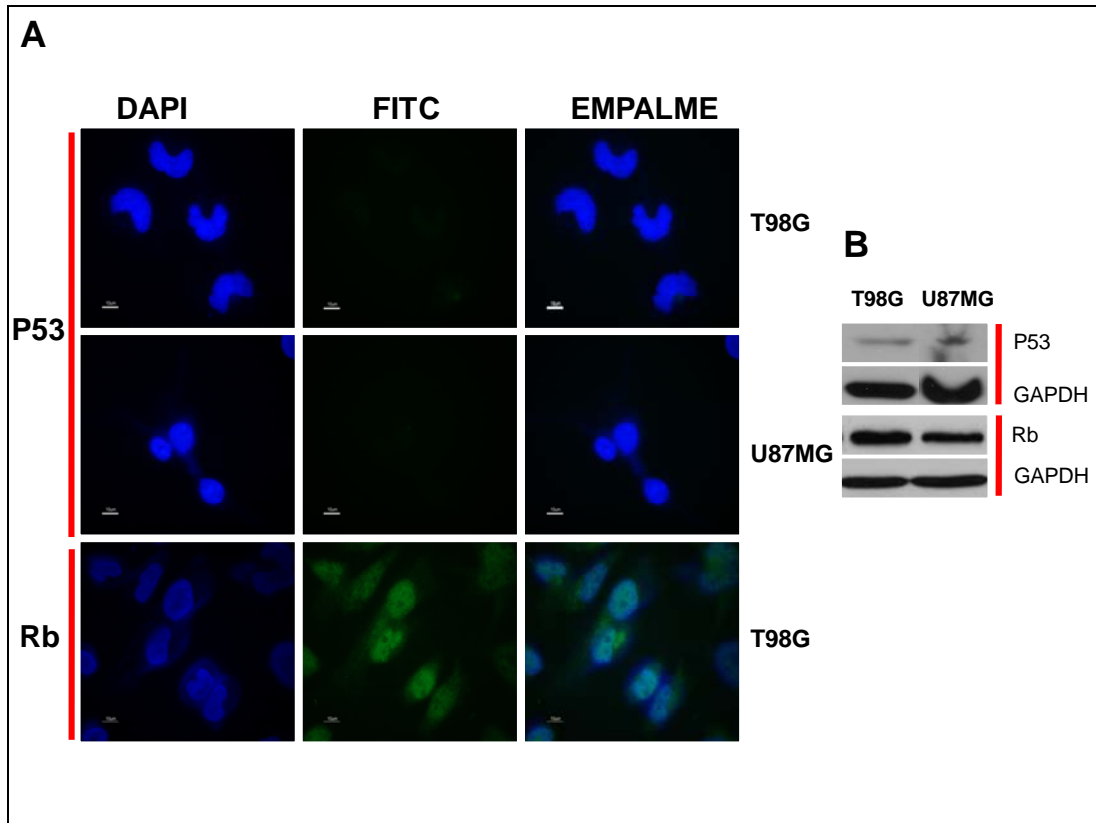
En conjunto estos datos establecen que el promotor de *p53* aparentemente está organizado en sub-dominios donde CTCF parece jugar un papel delimitador entre distintos sub-dominios y que su ausencia induce la incorporación diferencial de marcas represivas en las histonas como la H3K27me3, marca incorporada por

miembros del complejo Polycomb. Sobre sale el hecho de que la metilación del ADN aparentemente no está involucrada en el silenciamiento del promotor. Con base a estos datos, nos preguntamos si el fenómeno de silenciamiento epigenético mediado por marcas de histonas esta también presente en las líneas celulares provenientes de gliomas, las cuales de manera endógena CTCF no se une a la región 5' del promotor del gen.

## **7.- Modelo de silenciamiento epigenético del promotor del gen *p53* humano en líneas celulares de gliomas.**

### **7.1 Caracterización de líneas celulares provenientes de gliomas.**

Decidimos explorar otro linaje celular proveniente de líneas celulares de gliomas (T98G y U87MG), las cuales como se mencionó anteriormente han sido reportadas con un cierto grado de metilación en el promotor del gen *p53* humano (Amatya et al., 2005). Primero decidimos determinar si ambas líneas celulares son deficientes a la proteína p53. La distribución de p53 fue evaluada por medio de ensayos de inmunofluorescencia en las dos líneas celulares provenientes de gliomas (Figura 25A). Como control se evaluó la abundancia de Rb (Figura 25A, panel inferior). Estos resultados denotan que ambas líneas celulares (T98G y U87MG) carecen de p53, mientras que en la línea celular T98G, Rb se encuentra presente. Estos datos nos llamaron la atención debido a que en ambas líneas celulares, el factor CTCF no se asocia a la región 5' del promotor del gen *p53* (Figura 18C, panel inferior). Esto sugiere que dichas líneas celulares pueden ser utilizadas como un buen modelo de silenciamiento endógeno del promotor del gen *p53* humano, en donde CTCF no se encuentra unido en ésta región.

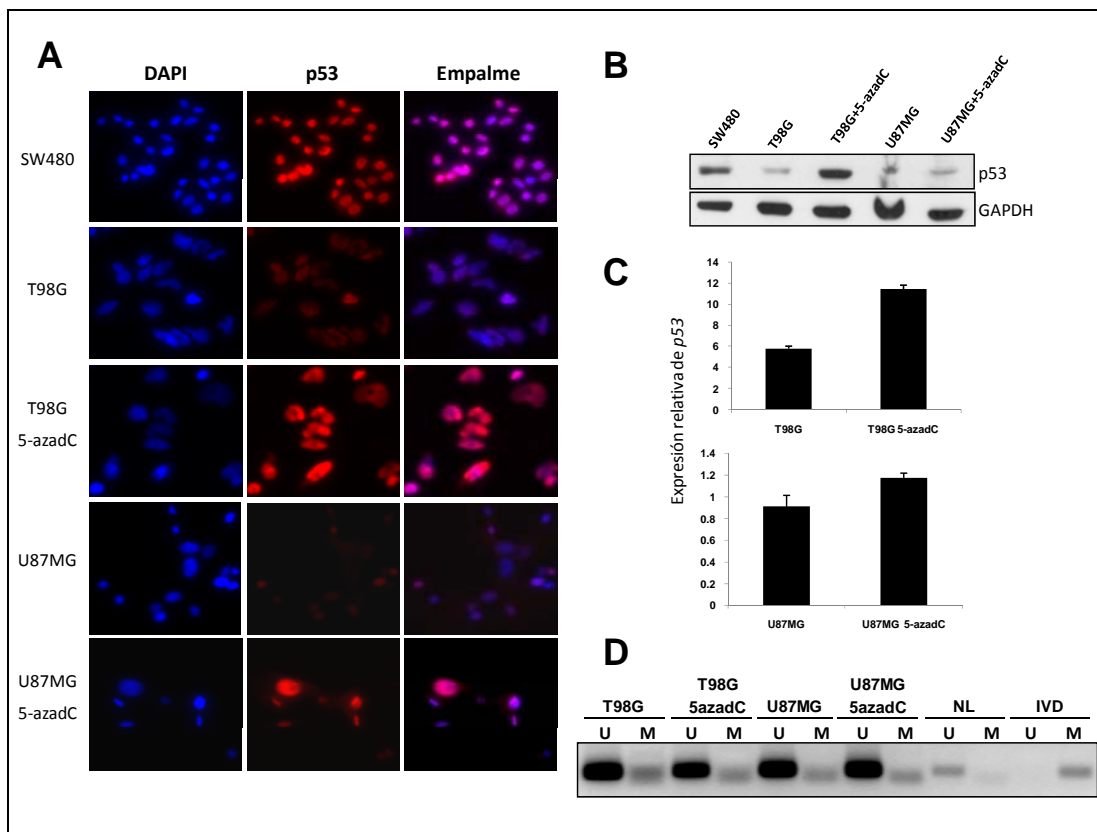


**Figura 25.** Caracterización de la abundancia de p53 en líneas celulares provenientes de gliomas. **A-** Inmunofluorescencia de p53 y Rb en las líneas celulares de glioma T98G y U87MG. Se utilizó el anticuerpo secundario de fluoresceína (FITC) para evidenciar tanto a p53 como Rb. **B-** Western blot de las líneas celulares de gliomas donde se determinó la abundancia de p53 y Rb.

## 7.2 Caracterización de los componentes epigenéticos involucrados en el silenciamiento del promotor del gen *p53* humano en líneas celulares de gliomas.

Debido a los antecedentes previos en la literatura los cuales muestran que ambas líneas celulares presentan metilación en la región promotora del gen, decidimos dar un tratamiento por 72 horas con el inhibidor de la metilación 5-aza-2'-deoxicitidina (5-azadC) (Jüttermann y Jaenisch, 1994; Cameron et al., 1999;

Cheng et al., 2003; De Vos, 2005). Post-tratamiento, evaluamos mediante ensayos de inmunofluorescencia la distribución de p53 en las líneas celulares T98G y U87MG (Figura 26A), como control positivo se utilizó a la línea celular SW480, la cual previamente reportamos con altos niveles de expresión del gen *p53* (Figura 13). Las líneas celulares sin tratamiento carecen de p53, comparadas con la línea SW480 (Figura 26A). Con el tratamiento con 5-azadC logramos reactivar la expresión de *p53*; estos datos sugieren que en las líneas celulares de gliomas el gen *p53* se encuentra silenciado por mecanismos epigenéticos, en particular, por metilación del ADN. Estos datos fueron corroborados por Western blot y RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) (Figura 26B y C).

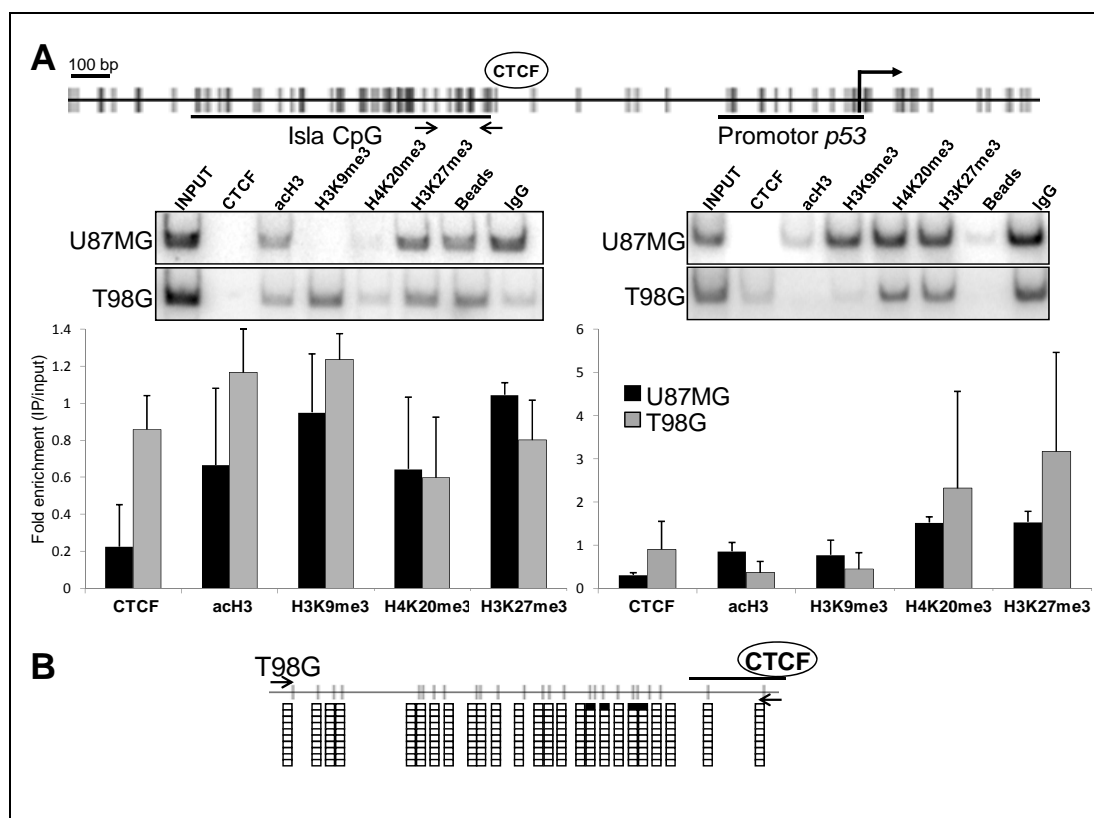


**Figura 26.** Evaluación del estado de metilación del ADN en las líneas celulares provenientes de gliomas. **A-** Inmunofluorescencias en contra de la proteína p53 en las líneas celulares T98G y U87MG tratadas por 72 horas con el inhibidor de la metilación 5-azadC (5  $\mu$ M). Como comparación de la abundancia de p53 se utilizó a la línea celular SW480. **B-** Análisis de Western blot en las líneas celulares tumorales tratadas con 5-azadC. **C-** Perfiles de expresión del gen *p53* evaluados por RT-PCR cuantitativa en líneas celulares de gliomas. **D-** Evaluación del estado de metilación del sitio de unión de CTCF mediante el ensayo de PCR sensible a metilación (MS-PCR) en líneas celulares de gliomas tratadas y no tratadas con 5-azadC. Como control de no ADN no metilado se utilizó ADN proveniente de linfocitos de sangre periférica (NL) y ADN metilado *in vitro* mediante la metilasa *SssI* (IVD). U representa el producto de amplificación del templado no metilado y M representa a la amplificación del producto del templado metilado.

Sorprendentemente, al evaluar el estado de metilación mediante el ensayo de bisulfito de sodio y secuenciación de las 16 CpGs presentes en el promotor del gen *p53* no logramos evidenciar metilación del ADN, (Figura 15, panel inferior; donde se analizaron ocho clonas las cuales fueron secuenciadas y comparadas). A su vez mediante el ensayo de PCR sensible a metilación no se detectó metilación del ADN en el sitio de unión a CTCF (Figura 26D). En conjunto estos resultados confirman por un lado que la expresión del gen *p53* es silenciada por metilación del ADN en líneas celulares de gliomas, y por el otro que el “core” del promotor de *p53* se encuentra hipometilado sugiriendo que la metilación del ADN se sitúa en alguna región distal o que su efecto es indirecto (ver discusión). De cualquier forma estas dos líneas celulares tumorales constituyen un buen modelo de estudio dado que el promotor del gen *p53* se mantiene silenciado por procesos epigenéticos, y donde la ausencia de CTCF parece contribuir al desarrollo de este proceso. Con estos antecedentes nos avocamos ahora en evaluar las modificaciones covalentes de las histonas distribuidas tanto en el sitio de unión a CTCF como en el “core” del promotor del gen *p53*.

### **7.3 CTCF y su papel epigenético en líneas celulares de gliomas.**

Con estos antecedentes nos avocamos ahora en evaluar las modificaciones covalentes de las histonas asociadas tanto en el sitio de unión a CTCF como en el “core” del promotor de *p53* en las líneas celulares de gliomas. Mediante ensayos de ChIP confirmamos la disociación de CTCF en la región 5' del promotor de *p53*, a su vez observamos la ganancia de marcas represivas en las histonas como la H3K20me3 y H3K27me3 (Figura 27A).



**Figura 27.** Cambios epigenéticos inducido por la ausencia de CTCF en el promotor del gen *p53* en células de gliomas. **A-** ChIP comparativo utilizando distintos anticuerpos que reconocen marcas de histonas asociadas a una cromatina tanto abierta como cerrada. Dicho ensayo se realizó utilizando células T98G y U87MG el promotor del gen *p53*. **B-** Análisis de metilación por bisulfito de sodio y secuenciación utilizando un par de oligonucleótidos indicados con flechas horizontales. Ver esquema en A, donde las flechas indican la posición de los mismos.

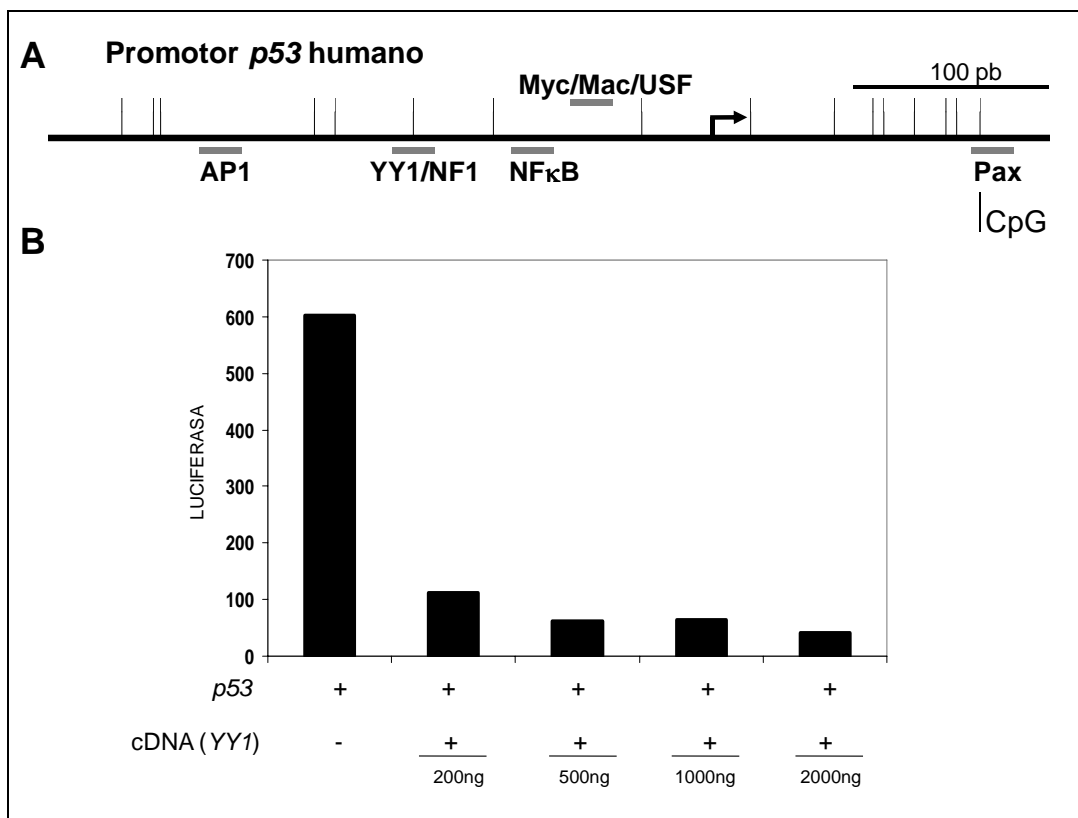


Inesperadamente, cuando analizamos el estado de metilación por bisulfito de sodio y secuenciación del sitio de unión de CTCF (~1 kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del promotor *p53*) una vez más, no logramos observar metilación del ADN (Figura 26D y 27B). Estos resultados apoyan el escenario en donde la metilación del ADN aparentemente no es el mecanismo principal de inactivación del promotor del gen *p53* humano. Posiblemente la ausencia de metilación tanto en el promotor del gen como en el sitio de unión a CTCF sea debido a que ésta se sitúa en secuencias distales a las estudiadas. Por otro lado, las modificaciones covalentes de las histonas como la H4K20me3 y la H3K27me3 aparentemente son los principales procesos epigenéticos asociados al silenciamiento del promotor del gen. Estas observaciones se ven apoyadas por los datos publicados por Issa y colaboradores (Kondo et al., 2008), donde se demuestra que la histona H3K27me3 juega un papel fundamental en el silenciamiento epigenético. Con estos resultados, una de nuestras principales inquietudes que surgen como perspectiva de este trabajo es el conocer quién puede ser el responsable de reclutar a los componentes asociados al grupo de Polycomb hacia el promotor del gen *p53* para incorporar esta marca.

#### **7.4 El papel del factor transcripcional YY1 en el silenciamiento epigenético del promotor del gen *p53* humano.**

Como anteriormente mencionamos la metil-transferasa de histonas EZH2 es uno de los componentes centrales del complejo represor Polycomb. Esta subunidad del complejo PcG es el responsable de establecer la marca represora H3K27me3 (Lund y van Lohuizen, 2004). Hasta hace poco tiempo se desconocían

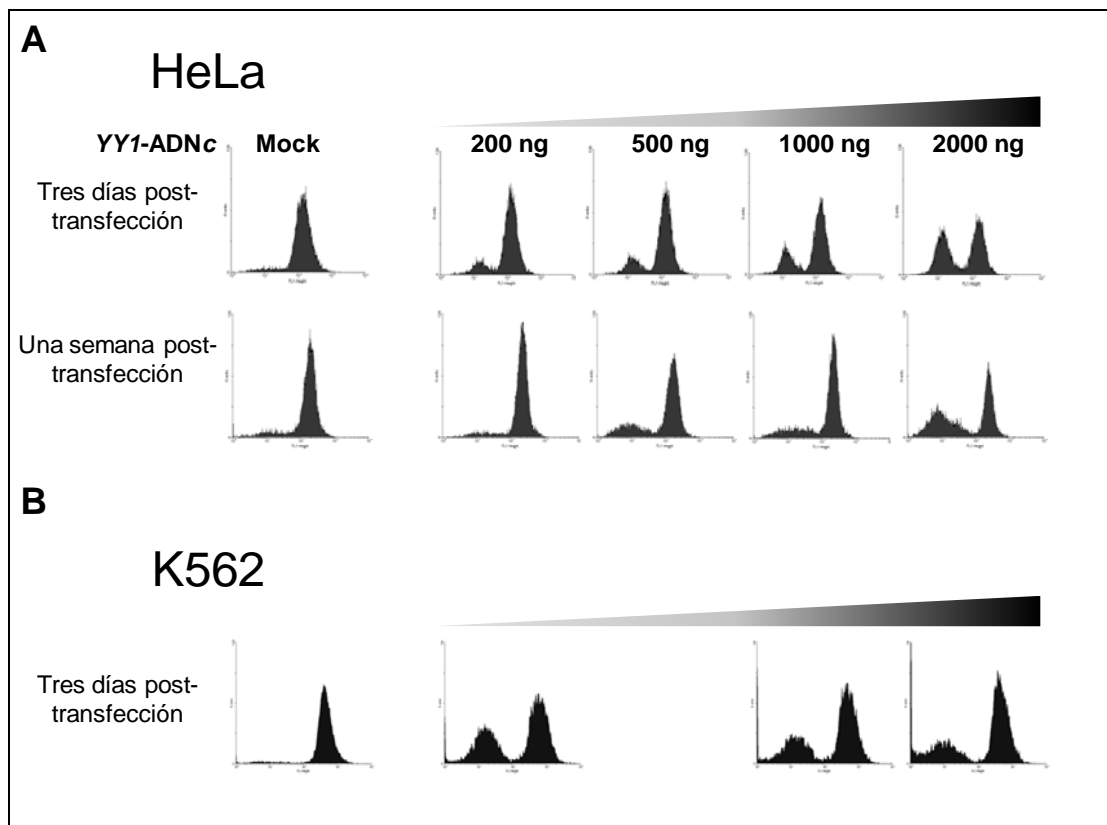
a ciencia cierta cómo los miembros Polycomb como PRC2, podían ser reclutados a sus genes blancos (ver Introducción). Especialmente, en el genoma de mamíferos no podido ser definidas secuencias de reconocimiento y atracción del complejo represor Polycomb (como los PRE en *Drosophila*). Recientemente se ha propuesto que el factor transcripcional YY1 puede ser un buen candidato para el reclutamiento del complejo represor PRC2, debido a que su homólogo en *Drosophila* (PHO) tiene la capacidad de reclutar a PRC2 en la *Drosophila* (Thomas y Seto, 1999; Simon y Lange, 2008). Interesantemente, el promotor del gen *p53* presenta un sitio de unión al factor transcripcional YY1 (Figura 28A), lo cual nos motivó a estudiar el posible papel de éste factor transcripcional en el silenciamiento epigenético del promotor del gen *p53* humano.



**Figura 28.** Efecto represor del factor transcripcional YY1 sobre la expresión de un transgen que contiene al promotor del gen *p53* humano. **A-** Esquema del “core” del promotor del gen *p53*, donde está contenido un sitio consenso de unión al factor transcripcional YY1. **B-** Transfección transitoria del promotor mínimo de *p53* que contiene a todos los sitios de unión a factores transcripcionales incluyendo a YY1 y que dirige la expresión del gen de la Luciferasa como reportero. Se transfeció el ADNc del YY1 humano a concentraciones creciente. Los datos se hicieron por duplicado y fueron evaluados 48 horas post-transfección, siendo normalizados con renilla.

Con el fin de evaluar el efecto del factor transcripcional YY1 sobre la actividad del promotor de *p53* realizamos una transfección transitoria del vector que contiene al promotor de *p53* en presencia de la Luciferasa como gen reportero y co-transfectado con el ADNc de YY1 humano a cantidades crecientes. A las 48 horas post-transfección se cosecharon las células y se cuantificaron los niveles de Luciferasa. En este ensayo se observó una disminución drástica de la actividad del promotor, en comparación con el control sin ADNc (Figura 28B). Estos datos sugieren que el factor transcripcional YY1 tiene un efecto represor sobre la actividad del promotor del gen *p53* humano (datos no publicados). De igual forma decidimos determinar si el mismo comportamiento era reproducible en construcciones integradas al genoma de células HeLa y K562 de manera estable que contienen como gen reportero a la proteína verde fluorescente (*GFP*). Una vez establecidas y caracterizadas, la expresión de *GFP* por citometría de flujo (FACS) de las líneas estables, procedimos a transfectar de manera transitoria al ADNc de YY1 en concentraciones crecientes (Figura 29). En este ensayo observamos un decremento en la expresión de *GFP* proporcional a la cantidad del ADNc transfectado en ambos contextos celulares (Figura 29). Un dato que nos llamó mucho la atención es que una semana post-transfección transitoria del ADNc de YY1, observamos que la mayoría de las líneas celulares se mantenían silenciada con un perfil similar a la observada a las 48 horas post-transfección

(Figura 29A, panel inferior para células HeLa). Este dato es relevante y merece un análisis más profundo, dado que sugiere la inducción y mantenimiento (en ausencia del estímulo) de un patrón represor de memoria epigenética que se transmite post-mitóticamente; en el cual el factor YY1 juega un papel importante. Por los antecedentes de la literatura nos parece sugerente que este silenciamiento epigenético y el posible establecimiento de una memoria epigenética represora sea mediado por el complejo represor de Polycomb (Francis et al., 2009).



**Figura 29.** Efecto represor del factor transcripcional YY1 sobre la expresión de un transgen integrado de manera estable bajo el control del promotor del gen *p53* humano y como gen reportero a la proteína verde fluorescente (*GFP*) como gen reportero en dos líneas celulares tumorales. **A-** Transfección transitoria del factor transcripcional YY1 a distintas concentraciones en células HeLa que contienen al gen de la *GFP* regulado por el promotor del gen *p53* humano. Las lecturas fueron evaluadas por citometría de flujo 48 horas post-transfección. El panel inferior representa a las mismas células evaluadas a las 192 horas de post-transfección. **B-** Transfección transitoria del factor transcripcional YY1 a distintas concentraciones en células eritroleucémicas

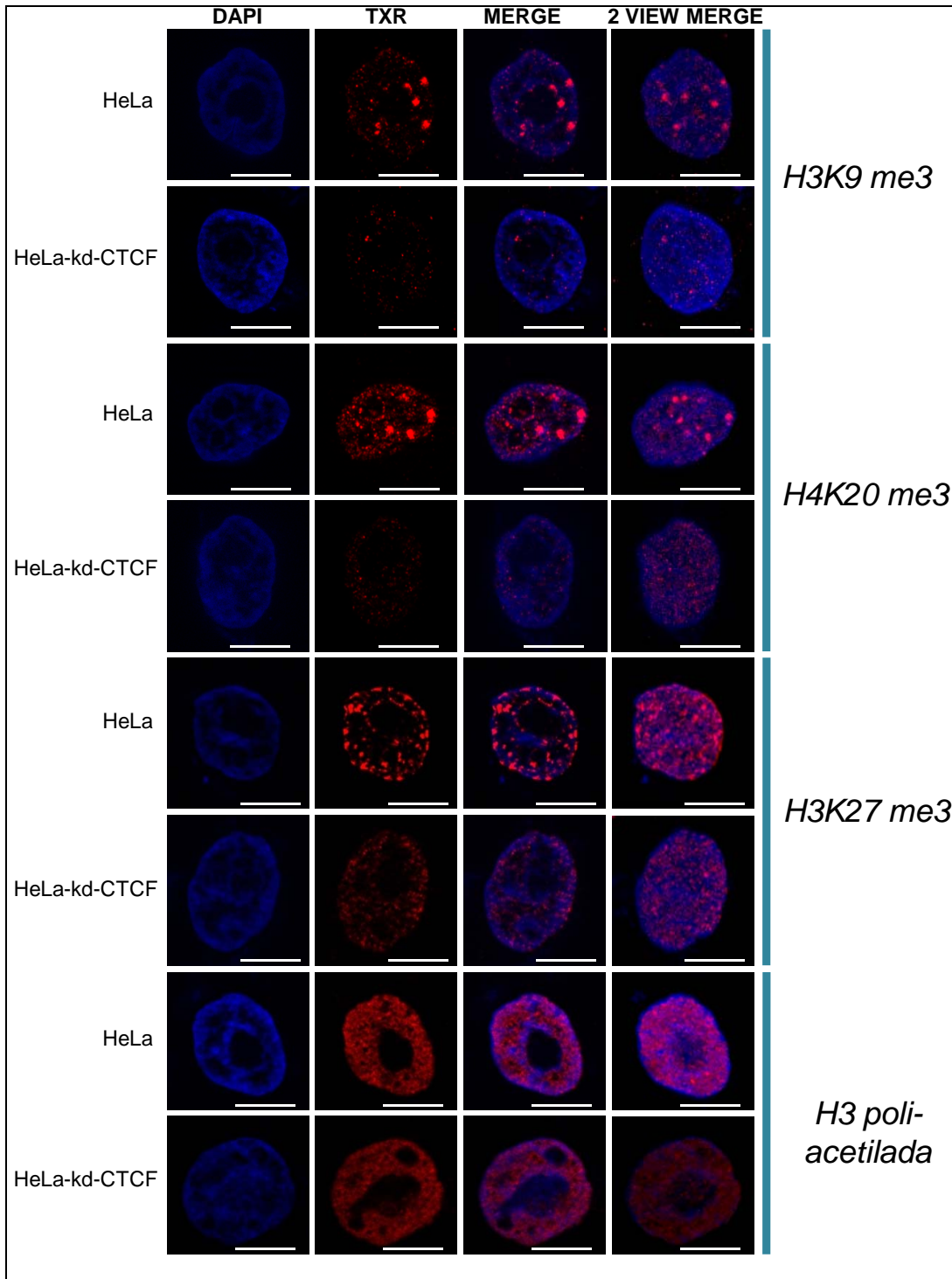
K562 que contienen al gen de la *GFP* regulado por el promotor del gen *p53* humano. Las lecturas fueron evaluadas por citometría de flujo 48 horas post-transfección.

## **8- El factor nuclear CTCF y su papel en la organización de las marcas de histonas al interior del núcleo.**

La organización del genoma al interior del núcleo es de gran importancia debido a que está involucrada en múltiples procesos tales como la transcripción génica, la replicación del ADN y en la formación de dominios cromatínicos como la eucromatina y heterocromatina (Chakalova et al., 2005). Especialmente las modificaciones en las histonas desempeñan un papel central en la estructuración de estos dominios, donde las marcas covalentes de las histonas H3K9me3, H3K27me3 y la H4K20me3 son las que predominan en la formación de heterocromatina (Ebert et al., 2006). Actualmente se ha propuesto que el factor nuclear CTCF tiene un papel importante en la organización del genoma al interior del núcleo (Gaszner y Felsenfeld, 2006; Phillips y Corces, 2009). A nivel local, se ha sugerido que CTCF tiene la capacidad de proteger sitios específicos en el genoma contra la metilación del ADN *de novo* y el enriquecimiento de marcas covalentes de las histonas asociadas a represión (Filippova et al., 2001; 2002; 2005; Splinter, 2006; De La Rosa-Velázquez et. al., 2007). A nivel global se ha propuesto que CTCF tiene la propiedad de delimitar dominios al interior del núcleo, lo cual repercute en una organización nuclear y en una regulación óptima de la transcripción génica (Recillas-Targa et al., 2006; Guelen et al., 2008; Williams y Flavell, 2008). Por esta razón nos interesamos en determinar cual pudiera ser el

efecto del abatimiento de la proteína CTCF de forma global en la organización de la cromatina, a nivel de las principales marcas post-traduccionales en las histonas.

Para abordar este punto realizamos experimentos de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos que reconocen distintas marcas de histonas vinculadas con represión transcripcional como H3K9me3, H3K27me3, H4K20me3 y por otra parte a la H3K4me2 como marca de activación en las líneas celulares HeLa y HeLa-kd-CTCF (Figura 30). Por medio del microscopio ApoTome (Carl Zeiss), se realizaron 12 cortes ópticos de 0.8  $\mu\text{m}$  en el plano Z con el fin de evaluar la distribución y organización de cada marca de histonas en los distintos contextos celulares. En células HeLa se observó un enriquecimiento de las marcas en las histonas H3K9me3, H3K27me3 y H4K20me3, resaltando un patrón en forma de mota, la cual podría asociarse con heterocromatina (Figura 30; Schotta et al., 2004).



**Figura 30.** Contribución funcional de CTCF en la organización nuclear de marcas de histonas. Inmunofluorescencias de marcas represivas en las histonas como H3K9me3, H3K27me3, H4K20me3 marcas asociadas a cromatina abierta como H3 poli-acetilada evaluadas en HeLa y HeLa-kd-CTCF.

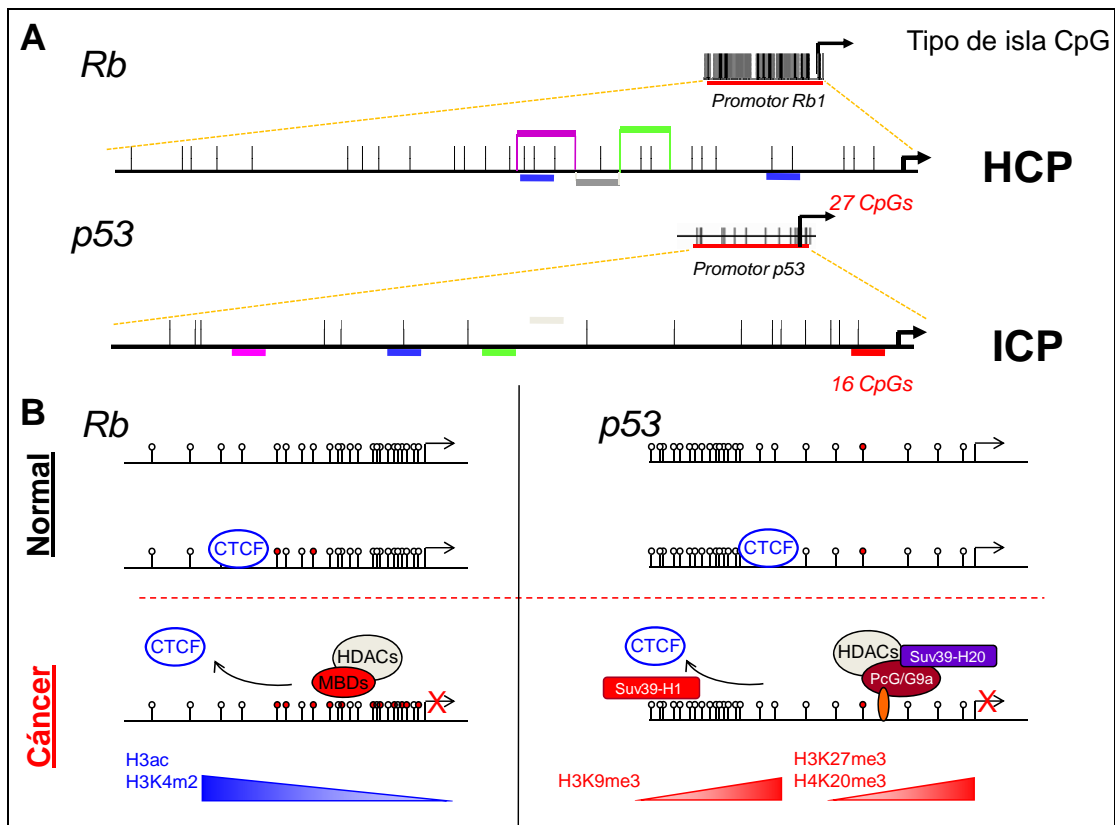
De manera sorprendente en células deficientes en CTCF (HeLa-kd-CTCF) se observó una redistribución de dichas marcas en las histonas, con un patrón más difuso y una menor densidad de motas al interior del núcleo. Dicha redistribución únicamente se observó para las modificaciones covalentes de las histonas asociadas a heterocromatina, ya que la poli-acetilación de la histona H3 no sufrió cambio alguno en ambos contextos celulares (Figura 30). Estos resultados nos llevan a proponer que esta reorganización general participa en la inactivación de los genes supresores de tumores *p53* y *Rb*. Estos datos podrían interpretarse en el sentido de una pérdida de la organización de dominios y su distribución topológica al interior del núcleo, que repercute en una ganancia de marcas represivas en múltiple genes lo que conlleva a su silenciamiento transcripcional. Actualmente se han caracterizado *in vivo* cerca de 14,000 sitios de unión a CTCF en el genoma humano, donde muchos de ellos se localizan en la frontera entre dominios de cromatina activa y cromatina cerrada (Barski et al., 2007). Estas observaciones apoyan el modelo en el cual el factor CTCF contribuye a la estructuración topológica de ciertas zonas del genoma al interior del núcleo. De igual forma, demostraciones experimentales recientes han puesto en evidencia que el factor CTCF tiene la capacidad de interactuar con múltiples péptidos, como proteínas de unión al ADN (como YB1, YY1, Kaiso entre otras), proteínas asociadas a la cromatina (como las cohesinas, CHD8, Suz12, SIN3A y H2A.Z), proteínas multifuncionales (como la nucleofosmina, PARP1, y Topo II) y proteínas misceláneas (como Lamina A/C, y la RNA polimerasa II, entre otras). Muchos de estos hallazgos apoyan a la función de CTCF en la estructuración del



genoma al interior del núcleo además de muchas otras funciones (Gause et al., 2008; Guelen et al., 2008; Wendt y Peters, 2009; Zlatanova y Caiafa, 2009).

## **DISCUSIÓN.**

En resumen, durante el desarrollo de la tesis doctoral logramos obtener los datos necesarios para poder proponer un mecanismo inicial que permite explicar cómo se protege al promotor del gen supresor de tumores *p53* humano en contra del silenciamiento epigenético especialmente aquel proveniente de modificaciones covalentes de las histonas. Caracterizamos un sitio de unión al factor nuclear CTCF que se encuentra en la región 5' a ~700 pb del sitio de inicio de la transcripción del gen *p53* humano. Este factor contribuye positivamente a la expresión del gen, fomentada y mantenida por una estructura de la cromatina laxa y permisiva para la transcripción. La ausencia de CTCF conlleva a un silenciamiento epigenético mediado principalmente por modificaciones post-traduccionales de las histonas como H3K9me3, H3K27me3 y H4K20me3, tanto en el promotor del gen como en el sitio de unión a CTCF. Estas evidencias sugieren que CTCF (en conjunción con otros factores) tiene la capacidad de proteger al promotor del gen en cuestión en contra de marcas de histonas asociadas a represión transcripcional. De manera inesperada, la metilación del ADN no parece estar involucrada en el silenciamiento de éste gen (Figura 31).



**Figura 31.** Modelo comparativo de silenciamiento de dos promotores de genes supresores de tumores con diferentes tipos de islas CpGs. **A-** Representación esquemática del promotor de *Rb* que se encuentra contenido en una isla CpG rica (HCP), en comparación al promotor de *p53* el cual presenta una isla CpG intermedia (ICP). **B-** Procesos epigenéticos involucrados en el silenciamiento de los promotores de los genes *Rb* y *p53*. Particularmente para *Rb* la ausencia de CTCF en cáncer repercute en la ganancia de metilación del ADN *de novo* y reclutamiento de proteínas de unión al ADN metilado (MBDs), mientras que para *p53* la ausencia de CTCF se asocia al enriquecimiento de marcas covalentes de las histonas ligada a la represión transcripcional (H3K9me3, H3K27me3, H4K20me3) tanto en el sitio de unión a este factor nuclear como en el “core” del promotor del gen.

Estos datos nos hacen proponer un modelo en donde las características inherentes de las islas CpGs (HCP, ICP o LCP) en condiciones anormales, fomentan un silenciamiento epigenético característico para cada tipo de isla CpG (Figura 31A y B). Siendo así, que las islas HCP como el caso del promotor del gen *Rb* son silenciadas principalmente por metilación del ADN y reclutamiento de proteínas de unión al ADN metilado (Figura 31A esquema izquierdo; De La Rosa-

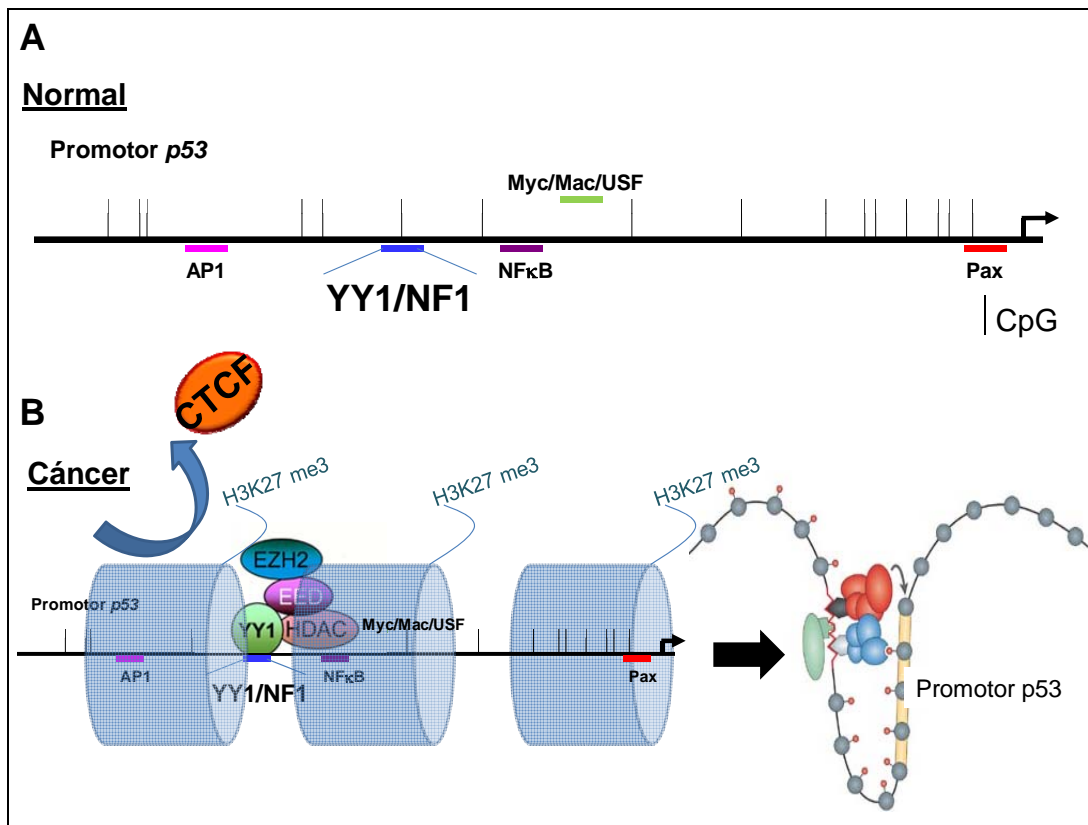
Velázquez et al., 2007). Mientras que aquellas que presenten islas CpGs con una densidad intermedia o baja (ICP o LCP), aparentemente la metilación del ADN no juega un papel relevante en su silenciamiento, más bien son silenciadas por modificaciones covalentes de las histonas asociadas a represión transcripcional (H3K9me3, H3K27me3 y H4K20me3) como lo observado para *p53* (Figura 31). En este punto, resulta evidente la necesidad de estudiar un mayor número de islas CpGs asociadas a promotores génicos para poder generalizar el modelo propuesto.

En conclusión este trabajo sugiere que aparentemente el factor nuclear CTCF tiene la capacidad de adaptarse o responder a diferentes contextos genómicos, en particular a los distintos tipos de islas CpGs protegiendo así a los elementos regulatorios que las contiene contrarrestando los distintos procesos de silenciamiento epigenéticos (Figura 31B; Weber et al., 2007; Kondo et al., 2008).

Hasta ahora poco se sabe de cómo las marcas post-traduccionales en las histonas son incorporadas a un sitio específico del genoma. Particularmente para el caso de Polycomb se ha propuesto que factores transcripcionales específicos como YY1 tienen la capacidad de reclutar a este complejo proteico a un sitio específico. Este fenómeno podría estarse llevando a cabo para en el caso del promotor del gen *p53* debido a que presenta una secuencia consenso de unión para este factor (Figura 32A). Nuestros datos proponen que el reclutamiento de Polycomb está asociado con el silenciamiento del gen. Por lo tanto la ausencia de CTCF puede favorecer la incorporación del factor transcripcional YY1 atrayendo así a miembros de Polycomb hacia al promotor del gen *p53* humano. Esto podría derivar en la consecuente incorporación de marcas covalentes de histonas

asociadas a represión transcripcional como H3K27me3 al promotor del gen teniendo como consecuencia su silenciamiento epigenético (Figura 32B).

Como se ha mencionado, los resultados obtenidos en el transcurso de este trabajo postulan que la presencia de CTCF en la región 5' del sitio de inicio de transcripción es indispensable para una correcta regulación del promotor *p53* humano. Recientemente se ha reportado CTCF sufre al menos dos modificaciones post-traduccionales que son la fosforilación y la poli(ADP-ribosil)ación; estas modificaciones son aparentemente indispensables para que CTCF pueda modular la estructura de la cromatina y la actividad normal del locus *p53* murino (Figura 33A; Su CH, 2008; Witcher y Emerson, 2009). De manera interesante, un tratamiento con el inhibidor de poli(ADP-ribosil)ación (3-ABA) sobre células HeLa derivó en el abatimiento de la expresión del gen *p53*, probablemente por la perturbación de la actividad de CTCF (Figura 23C). Estos datos sugieren que dichas modificaciones post-traduccionales pueden ser componentes importantes en la regulación de la actividad de CTCF, lo cual puede repercutir en la expresión de múltiples genes.

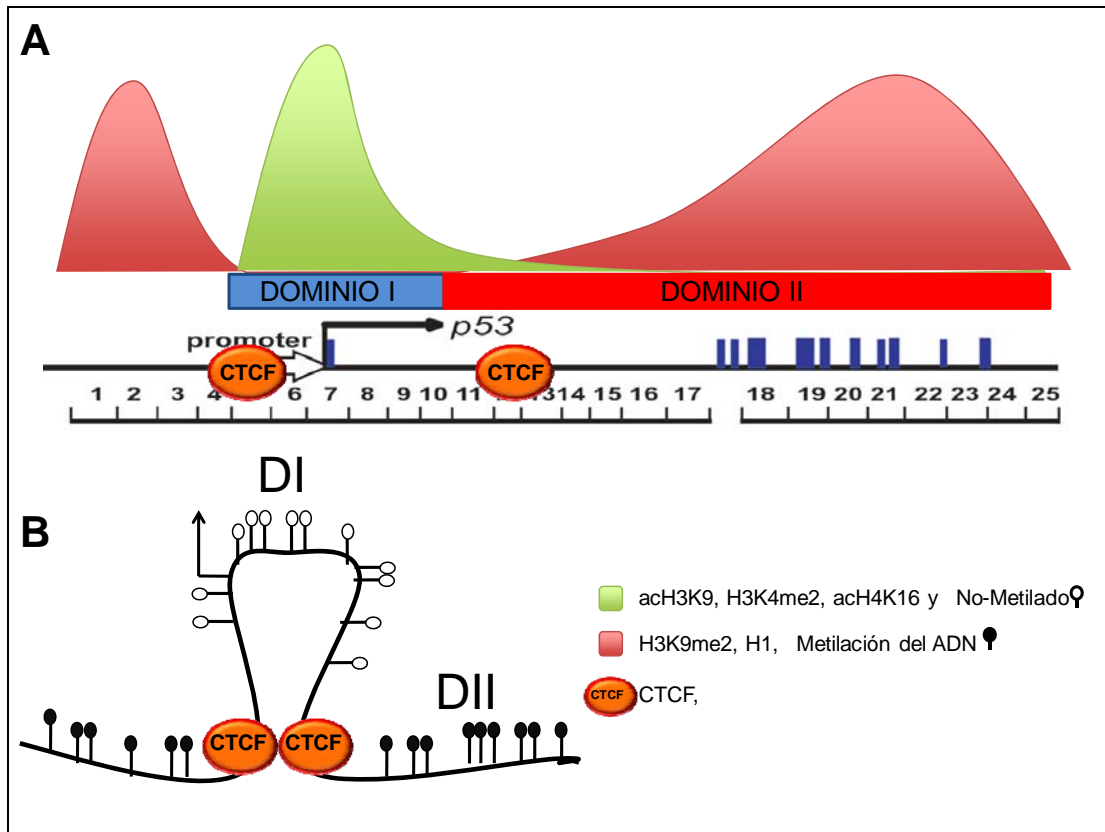


**Figura 32.** Modelo de silenciamiento epigenético del gen supresor de tumores *p53* mediado por el factor transcripcional YY1. **A-** Representación esquemática del promotor de *p53* donde se observa el sitio de unión consenso al factor transcripcional YY1. **B-** Se propone que en condiciones aberrantes como el cáncer, la ausencia de CTCF puede inducir el reclutamiento de miembros de Polycomb vía el factor transcripcional YY1, derivando en la trimetilación de la histona H3 lisina 27 (H3K27me3) fomentando así una estructuración compacta de la cromatina e induciendo silenciamiento transcripcional del gen.

Desde la perspectiva genómica, en una publicación reciente se demostró que el promotor del gen *p53* murino está organizado en dos dominios epigenéticos con características distintas (Su et al., 2008). El dominio I contiene al promotor del gen el cual se encuentra enriquecido de marcas covalentes de histonas asociadas a activación transcripcional (como la acetilación de la histona H3 lisina 9 (acH3K9), la H3K4me2 y la acH4K16) y carece de metilación del ADN, mientras que en el dominio II se observa el enriquecimiento de marcas en las histonas asociadas a represión transcripcional (Figura 33). Cabe señalar que el dominio que contiene al

promotor del gen esta acotado en cada lado por la unión del factor CTCF (Su et al., 2008). De manera interesante el sitio de unión de CTCF localizado en el límite del dominio I se mantiene constante a lo largo de la división celular, mientras que el CTCF presente en el límite del dominio II se disocia dependiendo de la fase del ciclo celular en que se encuentre. Estos datos postulan que el dominio I podría servir como marca de memoria epigenética del locus de *p53*, y que se necesita de ambos sitios de unión a CTCF para proteger contra el silenciamiento del promotor mediante procesos epigenéticos y topológicos a nivel genómico (Figura 33B). De manera interesante el dominio que incluye al gen *p53* humano muestra una conformación similar, donde en el promotor presenta enriquecimiento de marcas abiertas acotado por la unión *in vivo* de CTCF (Barski et al., 2007). Esto podría suponer que mecánicamente el comportamiento de *p53* humano podría ser similar al observado en ratón. Todas estas evidencias apuntan a que la presencia de CTCF en genes supresores de tumores como *p53* y *Rb* contribuye a su integridad epigenética y organización genómica.

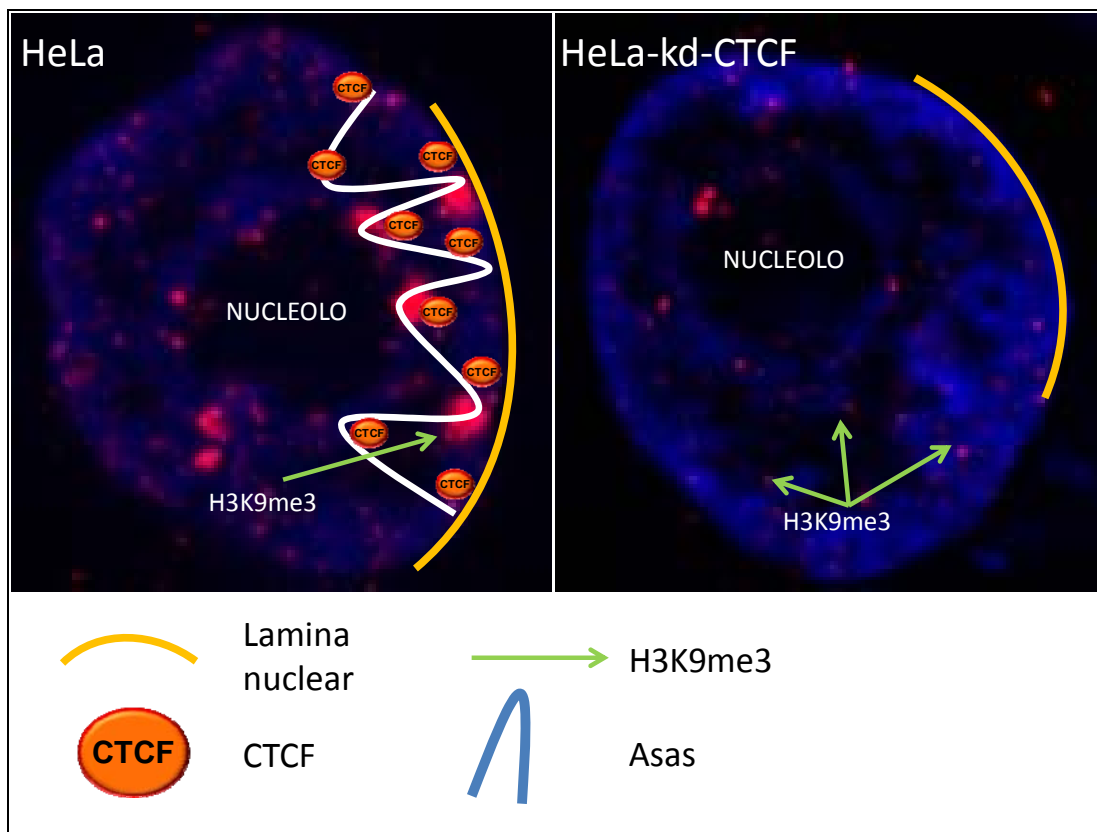
Uno de los aspectos más novedosos asociados a la regulación de la expresión del gen *p53* humano es la participación de un transcrito antisentido conocido como *Wrap53* (Mahmoudi et al., 2009). Este transcrito co-localiza con la región promotora del gen *p53* humano y su importancia estriba en que en ausencia de éste, se induce el abatimiento de la expresión del gen *p53* humano (Figura 18A). Una de las interrogantes que se sería interesante abordar es si la expresión de este transcrito también puede ser modulada por la unión de CTCF.



**Figura 33.** Organización del dominio que contiene al gen *p53* murino. **A-** Esquema de la región asociada al promotor del gen *p53* murino. Este está definido en dos dominios acotados por dos sitios de unión a CTCF *in vivo*. El dominio I el cual contiene al promotor del gen presenta enriquecimiento de marcas asociadas a la activación de la transcripción como la acetilación de la histona H3 lisina 9 (acH3K9), la H3K4me2, la acH4K16 y la ausencia de metilación del ADN. A su vez el dominio II presenta enriquecimiento de marcas ligadas a la represión como la H3K9me2, H1, y metilación del ADN. **B-** Se propone la formación de un asa o “loop” mediante el contacto de ambos CTCF delimitando cada uno de los dominios. La unión de ambos CTCF podrían proteger a la región promotora de procesos epigenéticos asociados a la represión transcripcional.

En concordancia con las distintas funciones de CTCF determinamos que su ausencia fomenta la redistribución de marcas covalentes en las histonas al interior del núcleo, sugiriendo que CTCF tiene un papel importante en la topología de la cromatina al interior del núcleo (Figura 30 y 34). Estudios de microscopía han reportado que zonas cromosómicas específicas se asocian a la lámina nuclear (LN) (Guelen et al., 2008). En particular las regiones cercanas a esta zona presentan una menor densidad de genes y se ven enriquecidas en marcas

covalentes de las histonas asociadas con la formación de heterocromatina. Experimentalmente se ha demostrado que los dominios cercanos a la LN están delimitados por el factor nuclear de CTCF, el cual forma una frontera entre las regiones asociadas a la LN y las regiones genómicas alejadas de ella, las cuales presentan una mayor densidad de genes (Guelen et al., 2008). Estos datos sugieren que CTCF contribuye a la organización del genoma y su relación con la dinámica nuclear, siendo que la pérdida de este elemento podría derivar en un desarreglo topológico de la cromatina y por ende una redistribución de las marcas covalentes de las histonas sobre las regiones génicas afectando la expresión de los genes asociados a estas zonas (Figura 34).





**Figura 34.** Modelo de la organización cromosómica en células en interfase mediada por el factor nuclear CTCF. La representación esquemática sugiere que en células HeLa se encuentran presentes las marcas covalentes de las histonas (H3K9me3, H3K27me3 y H4K20me3) enriquecidas en regiones en forma de motas. Se propone que el factor nuclear CTCF permite la regionalización de dominios cromosómicos al interior del núcleo. La pérdida de CTCF al interior del núcleo en células deficientes a CTCF (HeLa-kd-CTCF) puede fomentar una desorganización cromosómica derivando en una re-distribución de las marcas asociadas a heterocromatina. Esto pudiera repercutir en el silenciamiento de múltiples genes como los genes supresores de tumores.

## CONCLUSIÓN.

El cáncer es fundamentalmente una patología tanto genética, como epigenética que requiere la acumulación de estos dos tipos de alteraciones genómicas y que conllevan a la inactivación de genes supresores de tumores (*Rb*, *p53*) y/o la activación de proto-oncogenes como *Myc* y *Ras*, entre otros (Kent y Mendell 2006). En la actualidad aparte de los ya clásicos TSG y oncogenes se ha observado que ciertos microRNAs presentan funciones similares, en particular por los blancos que regulan. Por ello, se han visto implicados en la regulación de la proliferación, diferenciación celular y en apoptosis. En cáncer un gran número de los microRNAs se han visto desregulados, observándose tanto sobre-expresados como silenciados, lo cual contribuye a la transformación celular. Estudios recientes han demostrado que los microRNAs de la familia *hsa-miR-34* son componentes importantes de la vía de regulación de *p53*, por lo tanto han sido catalogados como genes supresores de tumores (Wendt y Peters, 2009; Bommer et al., 2007; Chang, et al., 2007; Raver-Shapira et al., 2007). A su vez se ha reportado que los microRNA *hsa-mir-125a* y *hsa-mir-125b* tienen la capacidad de unirse al extremo 3'-UTR de los genes *ERBB2* y *ERBB3*, respectivamente, apoyando su actividad de TSG (He et al., 2007). Aunque muchos de ellos se han visto desregulados en cáncer. En el presente estudio demostramos que los promotores predichos para los microRNAs *hsa-mir-34c*, y *hsa-mir-125-b1* están metilados, derivando en la disminución de la expresión de los mismos. Esto sugiere que la hipermetilación del ADN en islas CpGs de los elementos de control de los microRNAs *hsa-miR125-b1* y *hsa-mir-34c* representa un mecanismo de silenciamiento epigenético con consecuencias directas sobre sus genes blancos. Más importante aún, el

tratamiento con un inhibidor de metilación como la 5-aza-2'-deoxicitidina logra recuperar la expresión de los microRNAs por medio del borrado de la metilación del ADN.

### **PERSPECTIVAS.**

Con base a los resultados obtenidos relacionados con la de metilación del ADN en la secuencias de los promotores de los microRNAs, valdría la pena buscar nuevos blancos génicos de regulación de los microRNAs *hsa-miR-34c* y *hsa-miR-125b1*.

## ANEXOS

### **Anexo 1-**

#### **Estudio de la metilación del ADN en promotores de microRNAs en distintos contextos celulares y sus implicaciones sobre sus genes blancos.**

Estancia de investigación en el laboratorio de epigenética del cáncer dirigido por el Dr. Manel Esteller en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) Madrid, España (Enero a Junio de 2007).

Los microRNAs (miRNAs) pertenecen a una amplia familia de pequeños RNA no-codificantes, los cuales tienen múltiples funciones, como por ejemplo durante el desarrollo de plantas y animales, entre muchos otros procesos (Medina y Slack, 2008). Los miRNAs son RNAs pequeños de 21 a 25 nucleótidos (nt), los cuales tienen una vía principal de procesamiento (Figura 35). Esta se da cuando los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II lo cual deriva en la formación de un RNA denominado Pri-miRNA; a este transcrito primario se le adiciona una caperuza en el extremo 5', y que en su región 3' es poliadenilada, un procesamiento similar al que se observa para los RNAm codificantes. Posteriormente este Pri-miRNA es procesado co-transcripcionalmente por una RNAsa tipo III conocida como Drosha (Figura 35), formando así un precursor con un tamaño de 70 a 90 nt que presenta una estructura secundaria tipo tallo-asa conocido como pre-miRNA. Este es transportado al citoplasma por la exportina 5, donde es procesado por una endonucleasa RNAsa tipo III conocida como Dicer (Weber et al., 2007). Esto permite la formación de un RNA de doble cadena (dsRNA) de 21 a 25 pb



Universidad Nacional  
Autónoma de México



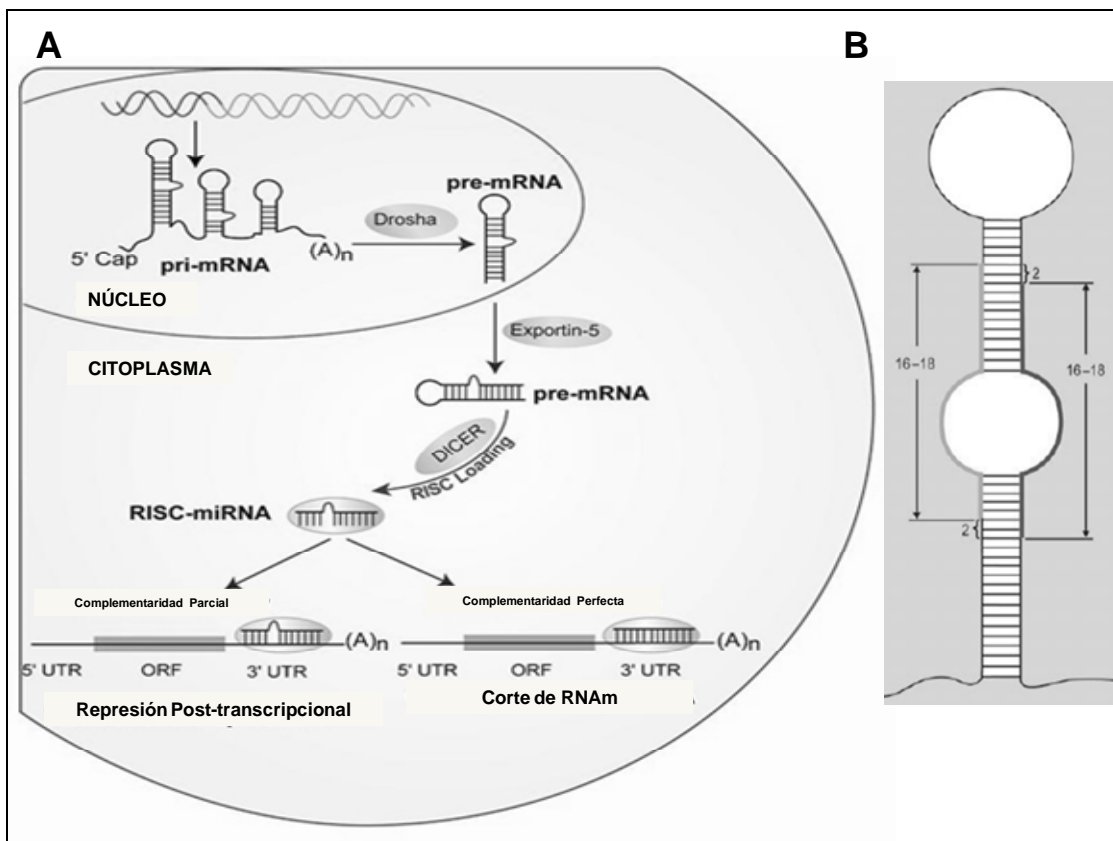
**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

(Figura 35A y B). Posteriormente una de las hebras es incorporada a un complejo proteico conocido como Complejo de silenciamiento inducido por RNA o RISC, mientras que la otra hebra es degradada. Consecutivamente el miRNA maduro acoplado a RISC presenta una secuencia complementaria a un RNA mensajero específico (o blanco), la cual cuando es perfecta conlleva al corte del mensajero, permitiendo así su degradación, o se aparea a la región 3'-UTR interfiriendo con la traducción del mensajero del gen blanco (Dalmay, 2008). Este fenómeno es importante en la regulación de los niveles de transcripción génica y por ende de la abundancia proteica. Siendo así que los miRNA representan un nuevo componente asociado en la regulación de la expresión génica.



**Figura 33.** Biogénesis de los microRNAs (miRNA). **A-** Los genes de miRNA son transcritos por la RNA pol II generándose un transcrito primario (pri-miRNA), a este se le adiciona una caperuja en el 5', y es poliadenilado en su extremo 3'. Este contiene estructuras tallo-asa, las cuales son reconocidas por un complejo proteico Drosha-DGCR8, el cual lo corta para formar una estructura conocida como precursor de miRNA o pre-miRNA. Posteriormente es transportado por la Exportina 5 hacia citoplasma, donde Dicer lo procesa a un RNA de doble

cadena (dsRNA) de 21 a 25 nt. Una de las hebras de RNA es incorporada a un complejo de silenciamiento inducido por RNA llamado RISC. La hebra sencilla de RNA es complementaria a un RNAm blanco. Cuando el reconocimiento de la hebra es parcial conlleva al arresto traduccional, si esta es perfecta deriva en el corte y degradación del RNA mensajero. **B**-Estructura tallo-asa de un pri-miRNA. En rojo se representa el miRNA maduro de 21nt. Este es procesado por diferentes RNAsas tipo III como Drosha y Dicer.

Por esto, los microRNAs se han vuelto un campo de estudio de gran interés, esto debido a que son importantes reguladores de múltiples genes en muchos organismos, además de verse involucrados en diversos tipos de enfermedades, incluyendo el cáncer (Lujambio y Esteller, 2007; Maziere y Enright, 2007; Garzon et al., 2009). Dentro de las actividades celulares que se han observado para algunos microRNAs se ha descrito una función oncogénica donde los miRNAs: *hsa-miR-17-92*, *hsa-miR-155* y *hsa-miR-372-373* se asocian con proliferación celular (Croce, 2009). De igual forma, otros microRNAs tienen actividad de genes supresores de tumores como *hsa-miR-15a* y el *hsa-miR-16* entre otros (Ma y Weinberg, 2008; Medina y Slack, 2008; Croce, 2009; Garzon et al., 2009).

Al igual que múltiples genes, los microRNAs pueden ser desregulados a nivel transcripcional tanto por eventos genéticos y/o epigenéticos (Medina y Slack, 2008). En la actualidad poco se conoce a cerca de los elementos regulatorios como promotores o enhancers que modulan la expresión de los microRNAs, en especial se desconocen los procesos que pudieran influir en su des-regulación transcripcional. Por esto, durante la estancia de investigación nos concentramos en determinar el estado de metilación de potenciales promotores de microRNAs cuyas regiones promotoras incluyen a una isla CpG. Como un primer abordaje del proyecto, nos enfocamos en determinar *in silico* las secuencias de microRNAs que pudieran ser blancos de genes involucrados en cáncer de mama como: *ERBB2* y *EGFR* y por otra parte, aquellos que estén

asociados con el desarrollo de tumores cerebrales como: el gen O-6-metilguanina-DNA metiltransferasa (*MGMT*) (Paz et al., 2004; Watanabe et al., 2007). Los proto-oncogenes *ERBB2* y *EGRF* también conocido como *HER-2/neu* y *HER-1*, respectivamente, codifican para un receptor de tirosina cinasa *trans*-membranal, la cual se ha visto sobre-expresada en varios tipos de cánceres como ovario, vejiga y mama, además de asociarse con un mal pronóstico (Scott et al., 2007; Tolmachev, 2008). Por otro lado, el gen *MGMT* está involucrado en reparación del ADN, en especial, se encarga de remover los aductos formados por los nucleótidos de guanina (Patel y Shervington, 2009). Este gen se ha visto inactivado en múltiples cánceres de cerebro, como los glioblastomas, donde la metilación el ADN es uno de los mecanismos comúnmente involucrado en su silenciamiento (Kondo et al., 2003).

### **OBJETIVO GENERAL.**

Determinar el efecto de la metilación del ADN sobre promotores de microRNAs y su acción sobre sus potenciales genes blancos.

### **OBJETIVOS PARTICULARES.**

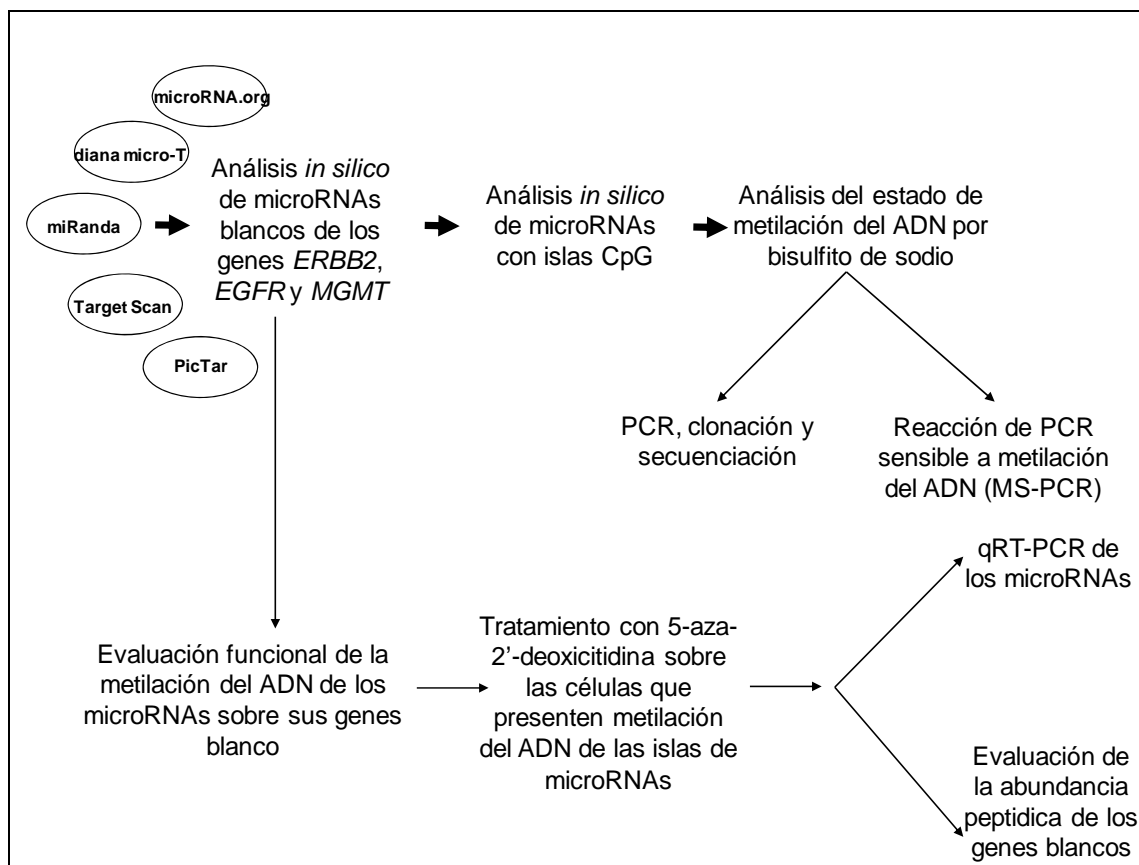
1. Definir *in silico* potenciales microRNAs que tengan como blanco a los genes *ERBB2*, *EGFR* y *MGMT*.
2. Caracterizar *in silico* a las regiones promotoras de microRNAs con base a la presencia de islas CpGs. Especialmente nos enfocaremos en aquellas que tengan como blanco a los genes antes mencionados.
3. Mediante el ensayo de bisulfito de sodio, secuenciación y/o PCR sensible a metilación determinar el estado de metilación del ADN de las islas CpGs pertenecientes a los microRNAs.



4. Evaluar el efecto biológico de la reactivación de los microRNAs por medio del inhibidor de la metilación 5-aza-2'-deoxicitidina.

## RESULTADOS.

En primera instancia determinamos *in silico* a un conjunto de microRNAs que pudieran tener como blanco a los genes *ERBB2*, *EGFR* y *MGMT* utilizando distintas bases de datos (Figura 36). Posteriormente, definimos *in silico* cuáles de los microRNAs contienen islas CpGs mediante el programa Methyl Primer Express® Software v1.0. Una vez realizado el tamizaje de los microRNAs candidatos a ser evaluados, y llevamos a cabo el estudio del estado de metilación del ADN de dichas islas CpGs mediante la técnica de bisulfito de sodio y secuenciación, como también mediante el ensayo de PCRs sensibles a metilación (MS-PCRs).



**Figura 36.** Diagrama de flujo diseñado y aplicado para el estudio de metilación del ADN de islas CpG asociadas a microRNAs que tienen por blanco a los genes *ERBB2*, *EGFR* y *MGMT*. Mediante múltiples bases de datos se buscan *in silico* a microRNAs que puedan ser blancos de los genes antes mencionados. Posteriormente se realiza un análisis *in silico* de islas CpG cercanas a los microRNAs que puedan ser inactivadas por metilación del ADN. Finalmente mediante ensayos de bisulfito de sodio secuenciación y/o reacción de PCRs sensible a metilación se evaluará el estado de metilación de cada uno de los microRNAs. Posteriormente se analizará el efecto biológico de la metilación del ADN mediante reactivaciones con 5-aza-2'deoxicitidina, para ello se determinará el patrón de la expresión y abundancia peptídica mediante qRT-PCRs y Western blot.

### **Determinación del estado de metilación de islas CpGs asociadas a microRNAs que tengan como blanco al gen *ERBB2*.**

Debido a que este gen se ha visto afectado mayoritariamente desregulado en cáncer de mama, decidimos evaluar el estado de metilación de los miRNAs que tuvieran islas CpG y que su blanco fuera *ERBB2*. Al hacer el análisis *in silico*, encontramos once posibles microRNAs candidatos con esas características (Figura 36 y 37). Posteriormente por medio del ensayo de bisulfito y secuenciación evaluamos el estado de metilación de los once microRNAs presentes en ADN extraído de nueve líneas celulares tumorales de cáncer mamario, como control utilizamos ADN proveniente de tejido mamario normal y de linfocitos de sangre periférica de un individuo sano.

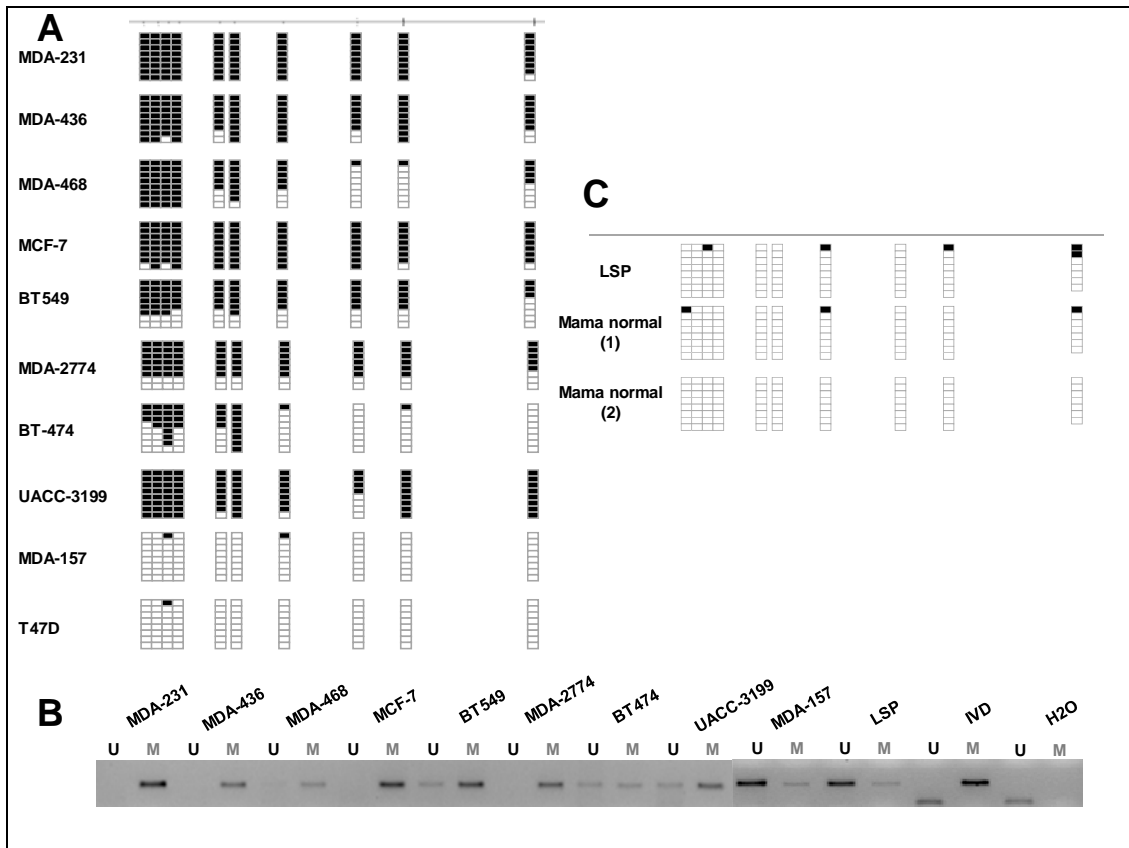
LINEAS CEL.	ESTIRPE											
		miR-375	miR-485	miR-125a	Let7-3a	miR-125b1	miR-296	miR-410	miR-432	miR-594	miR-611	miR-663
MDA-231	Ca. Mama	UN	HEM	MET	MET	MET	HEM	HEM	HEM	UN	UN	MET
MDA-436	Ca. Mama	HEM	MET	MET	MET	MET	HEM	MET	HEM	UN	UN	HEM
MDA-468	Ca. Mama	UN	UN	MET	MET	HEM	MET	HEM	HEM	UN	UN	MET
MCF-7	Ca. Mama	UN	MET	MET	MET	MET	MET	MET	MET	UN	UN	MET
BT549	Ca. Mama	HEM	MET	MET	MET	MET	MET	MET	MET	UN	UN	MET
MDA 2774	Ca. Mama					MET						
BT 474	Ca. Mama					HEM						
UACC 3199	Ca. Mama					MET						
MDA 157	Ca. Mama					UN						
Mama normal	Mama	UN	MET	MET	MET	UN	MET	MET	MET	UN	UN	HEM
Mama normal	Mama					UN						MET
LSP normales	LSP					UN						MET

UN	NO-METILADO
MET	METILADO
HEM	HEMIMETILADO

**Figura 37.** Análisis del estado de metilación de miRNAs que tienen como posible blanco al gen *ERBB2* en líneas celulares de estirpe mamario. Como control de la técnica se evaluó el estado de metilación en tejido mamario normal y en linfocitos de sangre periférica (LSP) de un individuo sano. Se secuenciaron al menos 8 clonas independientes de cada una de las secuencias genómicas modificadas por bisulfito de sodio provenientes de los microRNAs). UN, representa al análisis de 8 clonas independientes donde no se observa metilación del ADN; MET, representa al análisis de 8 clonas independientes donde se observa un 70% de metilación del ADN en su isla CpG, y HEM representa el análisis de 8 clonas independientes donde el estado de metilación del ADN oscila entre un 40 a un 60% en el total de las clonas estudiadas.

Con este estudio demostramos que solo las islas CpG presentes en los microRNAs *hsa-miR-125b1*, *hsa-miR-375*, *hsa-miR-594* y *hsa-miR-611* se encuentran en un estado no metilado tanto en ADN proveniente de tejido mamario normal, como de linfocitos de sangre periférica de un individuo sano. De manera interesante, el ADN correspondiente a la isla CpG asociada al *hsa-miR-125b1* se encontró hipermetilado en la mayoría de las líneas celulares provenientes de cáncer mamario con excepción de la línea celular MDA-MB-

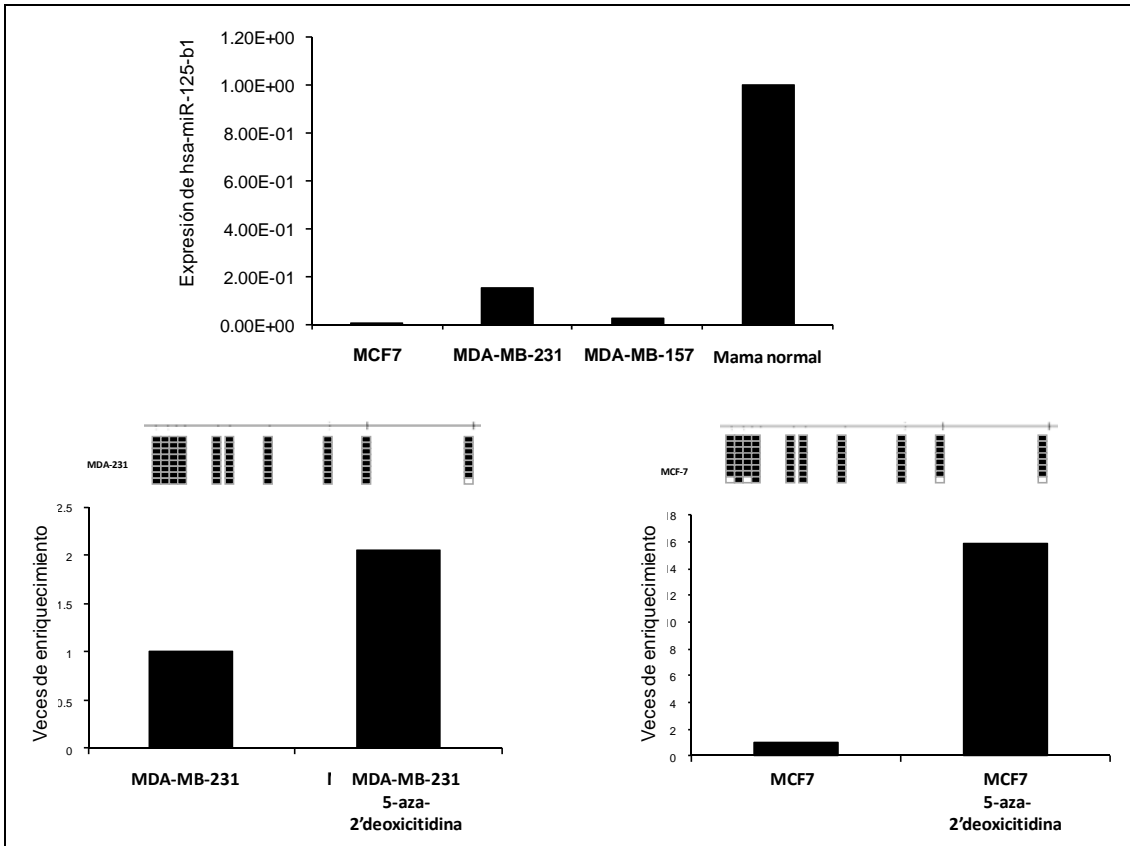
157, datos que fueron corroborados por reacciones de PCR sensibles a metilación (MS-PCR) (Figura 38A y B), como control se utilizó ADN obtenido de dos tejidos mamarios normales independientes y de linfocitos de sangre periférica (Figura 38C). Por ello, nos concentramos en el *hsa-miR-125b1*, donde se evaluó su expresión mediante qRT-PCR en las líneas celulares de cáncer mamario MCF7, MDA-MB-231 y MDA-157. Los datos mostraron una disminución en la expresión de este microRNA en comparación con tejido mamario normal. Con el fin de corroborar si dicha metilación pudiera tener un efecto sobre la expresión de este microRNA, decidimos realizar un tratamiento con la 5-aza-2'-deoxicitidina. En las líneas celulares donde se había observado una hipermetilación del ADN en el promotor del microRNA *hsa-mir-125b1* demostramos una clara reactivación en su expresión (Figura 39). Obtuvimos este mismo resultado en la línea celular de cáncer mamario SKBR3, la cual sobre-expresa al gen *ERBB2* (Figura 40).



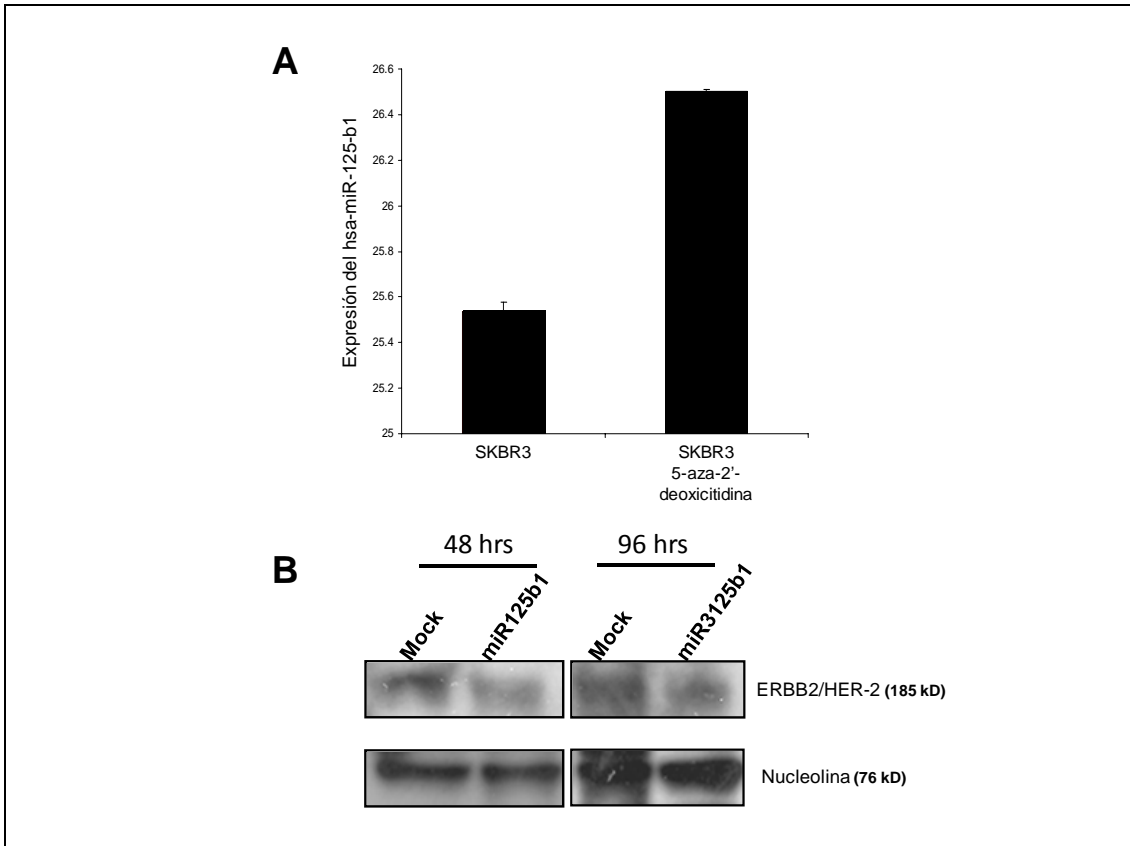
**Figura 38.** Análisis del estado de metilación del ADN del microRNA *hsa-miR-125b1*.

**A-** Análisis del estado de metilación del ADN por bisulfito de sodio y secuenciación de la isla CpG cercana al microRNA *hsa-miR-125b1*. **B-** Evaluación del estado de metilación del ADN de la isla CpG de este microRNA, mediante reacciones de PCR sensible a metilación (MSP) en distintas líneas celulares tumorales de cáncer mamario, como control positivo de la metilación se utilizó ADN metilado *in vitro* por medio de la metilasa *SssI* (IVD). U representa a al producto de amplificación del templado no metilado y M representa a la amplificación del producto del templado metilado. **C-** Como control se utilizó ADN convertido por bisulfito de sodio obtenido de linfocitos de sangre periférica de un individuo sano y de dos tejidos mamario normales independientes.

Centramos nuestra atención en la línea celular SKBR3 la cual fue tratada con 5-aza-2'-deoxicitidina por 72 horas. Post-tratamiento logramos reactivar la expresión del microRNA *hsa-mir-125b1*. Con la finalidad de corroborar nuestros datos se transfectó el precursor del *hsa-mir-125b1* en la línea celular SKBR3, con lo cual se evidenció una disminución en la abundancia de la transcripción del gen *ERBB2* (Figura 40).



**Figura 39.** Evaluación de la expresión del microRNA *hsa-miR-125b1* mediante RT-PCR en tiempo real (q-RT-PCR) en tres líneas celulares de estirpe mamario comparado con tejido mamario normal. Reactivación de la expresión del microRNA *hsa-miR-125-b1* con un tratamiento de 5-aza-2'-deoxicitidina en las líneas celulares mamarias MDA-MB-231 y MCF7. Estos datos se realizaron por duplicado por lo cual las gráficas carecen de barras de error.



**Figura 40.** Evaluación de la transcripción del microRNA *hsa-miR-125-b1* y abundancia de ERBB2/HER-2 en la línea celular de cáncer mamario SKBR3. **A-** Niveles de la transcripción del microRNA *hsa-miR-125b1* determinados por una reacción de PCR en tiempo real (qRT-PCR) en la línea celular SKBR3 de mama. **B-** Determinación de la abundancia de ERBB2 por medio del ensayo de Western blot en SKBR3 post-transfección del precursor de *hsa-miR-125b1*.

Estos resultados sugieren que la expresión del microRNA *hsa-mir-125b1* está disminuida a causa de la metilación del ADN en su isla CpG asociada a su región promotora, y la reactivación de su expresión se correlaciona con el decremento de la expresión del gen *ERBB2*. Estas observaciones concuerdan con datos publicados, donde el microRNA *hsa-mir-125a* y *hsa-mir-125b* tienen un efecto represor sobre la traducción de ERBB2 y ERBB3, respectivamente (He et al., 2007).

## Determinación del estado de metilación de islas CpGs asociadas a microRNAs que tengan como blanco al gen *EGFR*.

Utilizando el mismo abordaje se analizaron *in silico* a todos los microRNAs que pudieran tener como blanco al producto de la expresión del gen *EGFR*. Se evaluó el estado de metilación de las islas CpGs que conforman parte de los elementos de regulación de estos microRNAs demostrando que el microRNA *hsa-mir-34c* no se encuentra metilado en tejido normal de colon y pulmón, mientras que en todas las líneas celulares de colon las islas CpGs están hipermetiladas (Figura 41). Por su parte, para las líneas celulares pertenecientes a estirpe pulmonar encontramos diferencias en su estado de metilación (6 no metiladas de 10 líneas celulares analizadas).

LÍNEA CEL.	ESTIRPE	miR128-1	miR128-2	miR34c
SW480	colon	HEM	HEM	MET
SW460	colon	MET	MET	MET
HCT116	colon	MET	MET	MET
HCT15	colon	HEM		MET
H522	Pulmón	HEM	MET	UN
A549	Pulmón	HEM	MET	UN
A673	Pulmón			UN
H427	Pulmón			MET
H23	Pulmón			UN
H441	Pulmón			MET
H1299	Pulmón			MET
H2126	Pulmón			UN
Calu2	Pulmón			UN
LoVo	colon			MET
CaCo2	colon			MET
RKO	colon			MET
HT2919	colon			MET
L5147	colon			MET
D2D1	colon			MET
Colon Normal	colon	MET	MET	UN
Pulmón Normal	Pulmón	MET	MET	UN
Colon Normal	colon			UN
Pulmón Normal	Pulmón			UN

EGFR (Cáncer de pulmón y colon)

UN

MET

HEM

NO- METILADO

METILADO

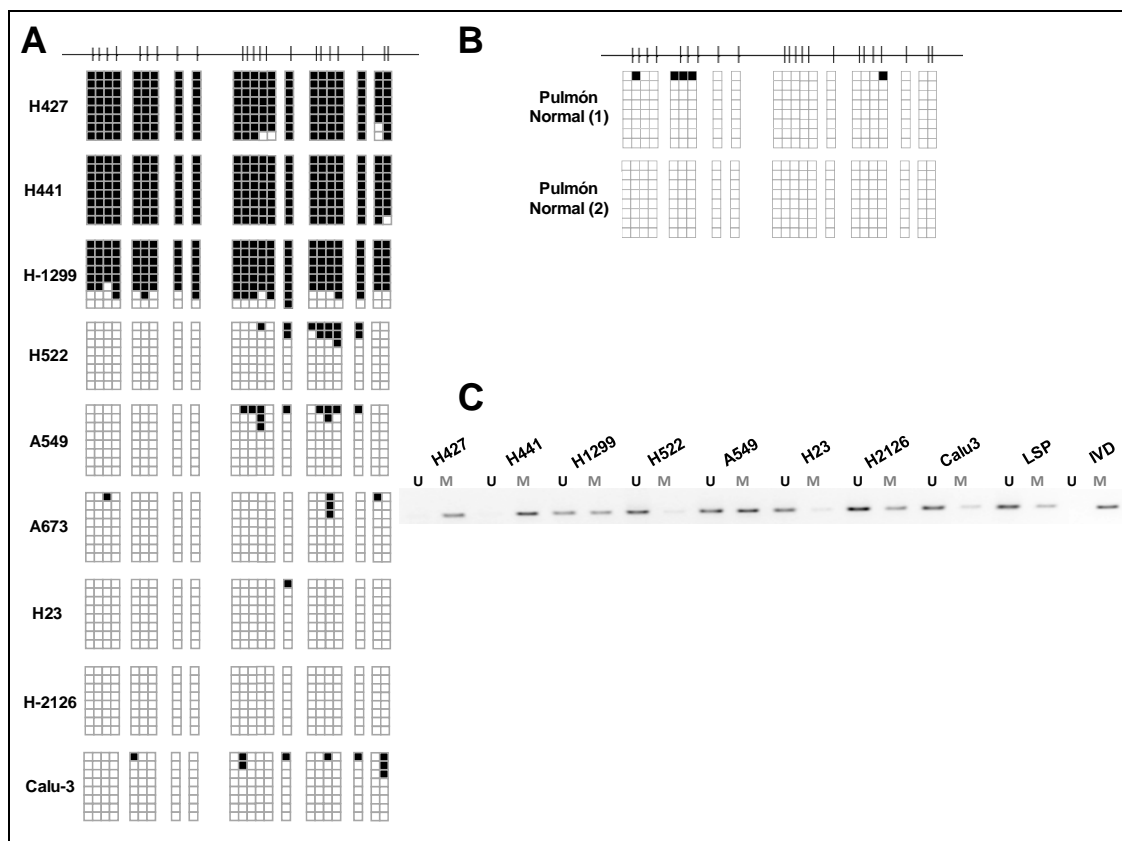
HEMIMETILADO

**Figura 41.** Análisis del estado de metilación del ADN presente en las islas CpGs cercanas a los miRNAs que tienen como blanco al gen *EGFR* evaluado en líneas celulares de cáncer de colon y pulmón. UN, corresponden a secuencias no metiladas. UN, representa al análisis de 8 clonas independientes donde no se observa metilación del ADN; MET, representa al análisis de 8 clonas independientes donde se observa un 70% de metilación del ADN en su isla CpG, y HEM



representa el análisis de 8 clonas independientes donde el estado de metilación del ADN oscila entre un 40 a un 60% en el total de las clonas estudiadas.

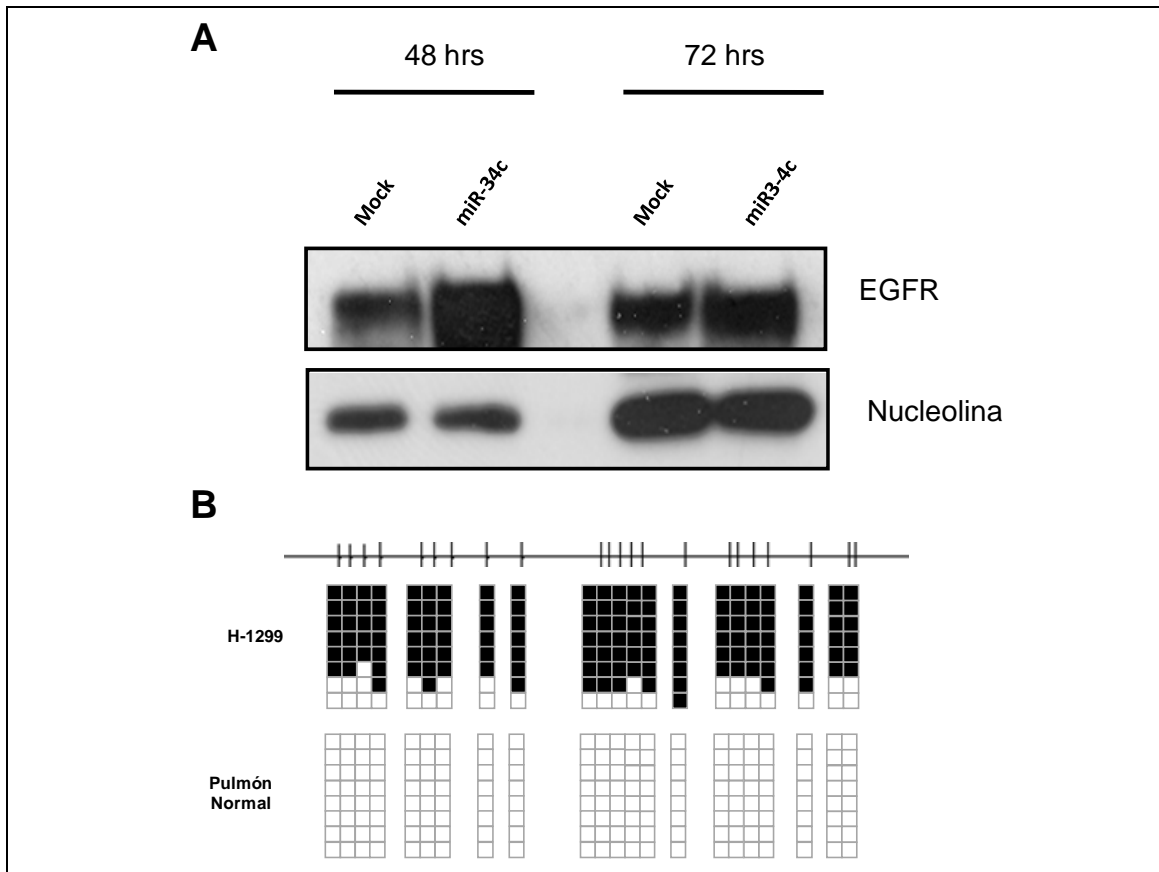
Con base a estos resultados, decidimos concentrar nuestros esfuerzos en estudiar el estado de metilación del ADN del microRNA *hsa-mir-34c* para cada una de las líneas celulares de estirpe pulmonar, el cual fue evaluado, por ensayos de bisulfito de sodio y secuenciación (Figura 42A). Encontramos que únicamente las líneas celulares de cáncer pulmonar H-427, H-441 Y H-1299 presentaban un patrón de hipermetilación y como control se utilizó ADN obtenido de dos tejidos pulmonares normales (Figura 42B). Éste resultado fue corroborado por ensayos de PCR sensible a metilación (MS-PCR; Figura 42C).



**Figura 42.** Análisis del estado de metilación del ADN de la isla CpG cercana al *hsa-mir-34c*. **A-** Evaluación del estado de metilación del ADN por bisulfito de sodio y secuenciación de la isla CpG cercana al microRNA *hsa-mir-34c*. **B-** Como control se utilizó ADN convertido por bisulfito de sodio obtenido de dos tejidos pulmonares normales independientes. **C-** Evaluación del estado de metilación del ADN de la isla CpG de este microRNA, mediante reacciones de PCR sensible a metilación (MSP) en distintas líneas celulares tumorales de cáncer mamario, como

control positivo de la metilación se utilizó ADN metilado *in vitro* por medio de la metilasa SssI (IVD). U representa a al producto de amplificación del templado no metilado y M representa a la amplificación del producto del templado metilado.

Esta familia de microRNAs es ampliamente estudiada debido a que se les ha asociado con una función de gen supresor de tumores, en particular, se han visto involucrados en el arresto del ciclo celular, senescencia y apoptosis (Welch y Wang, 1995). En mamíferos la familia de *miR-34* está compuesta principalmente por tres microRNAs, donde *hsa-miR34b* y *hsa-miR-34c* quienes comparten un transcrito primario en común. La expresión de estos microRNAs varía dependiendo de los tejidos. En ratón el miR-34a se expresa mayoritariamente en cerebro, mientras que los *mirR-34b/c* se expresan en pulmón sugiriendo una actividad tejido específica (Bommer et al., 2007). Es por ello que nos avocamos en tratar de determinar una función biológica para dicho microRNA, restituimos la expresión del microRNA mediante la transfección del microRNA maduro *hsa-miR-34c* en la línea celular H-1299 proveniente de cáncer de pulmón, donde sabemos que el promotor de este microRNA se encuentra hipermetilado.



**Figura 43.** Efecto funcional del microRNA *hsa-miR-34c* sobre la expresión del gen *EGFR*. **A-** Western blot en la línea celular pulmonar H-1299 post-transfección del precursor de *hsa-miR-34c*. En dicho ensayo se transfectó cada 24 horas el siRNA, donde los datos se evaluaron a 48 horas y 72 horas, respectivamente. Como control negativo se transfectó a *hsa-miR-1*. **B-** Evaluación por bisulfito de sodio y secuenciación de la metilación del ADN del promotor del *hsa-miR-34c* en la línea celular H-1299 transformada de pulmón y en tejido normal de pulmón. Los recuadros negros indican metilación del ADN de un CpG y los blancos ausencia de metilación del ADN.

## CONCLUSIÓN.

El cáncer es fundamentalmente una patología tanto genética, como epigenética que requiere la acumulación de estos dos tipos de alteraciones genómicas y que conllevan a la inactivación de genes supresores de tumores (*Rb*, *p53*) y/o la activación de proto-oncogenes como *Myc* y *Ras*, entre otros (Kent y Mendell 2006). En la actualidad aparte de los ya clásicos TSG y oncogenes se ha observado que ciertos microRNAs presentan funciones similares, en particular por los blancos que regulan. Por ello, se han visto implicados en la regulación de la proliferación, diferenciación celular y en apoptosis. En cáncer un gran número de los microRNAs se han visto desregulados, observándose tanto sobre-expresados como silenciados, lo cual contribuye a la transformación celular. Estudios recientes han demostrado que los microRNAs de la familia *hsa-miR-34* son componentes importantes de la vía de regulación de *p53*, por lo tanto han sido catalogados como genes supresores de tumores (Wendt y Peters, 2009; Bommer et al., 2007; Chang, et al., 2007; Raver-Shapira et al., 2007). A su vez se ha reportado que los microRNA *hsa-mir-125a* y *hsa-mir-125b* tienen la capacidad de unirse al extremo 3'-UTR de los genes *ERBB2* y *ERBB3*, respectivamente, apoyando su actividad de TSG (He et al., 2007). Aunque muchos de ellos se han visto desregulados en cáncer. En el presente estudio demostramos que los promotores predichos para los microRNAs *hsa-mir-34c*, y *hsa-mir-125-b1* están metilados, derivando en la disminución de la expresión de los mismos. Esto sugiere que la hipermetilación del ADN en islas CpGs de los elementos de control de los microRNAs *hsa-miR125-b1* y *hsa-mir-34c* representa un

mecanismo de silenciamiento epigenético con consecuencias directas sobre sus genes blancos. Más importante aún, el tratamiento con un inhibidor de metilación como la 5-aza-2'-deoxicitidina logra recuperar la expresión de los microRNAs por medio del borrado de la metilación del ADN.

## **PERSPECTIVAS.**

Con base a los resultados obtenidos relacionados con la de metilación del ADN en la secuencias de los promotores de los microRNAs, valdría la pena buscar nuevos blancos génicos de regulación de los microRNAs *hsa-miR-34c* y *hsa-miR-125b1*.

## **Anexo 2-**

### **Efecto de la metilación *in vitro* sobre los promotores de genes supresores de tumores *Rb* y *p53*.**

Aproximadamente el 70% de los promotores de genes humanos se encuentran asociados a islas CpGs. De estos se ha reportado que de 15,609 promotores humanos se pueden catalogar principalmente en tres tipos con relación a la densidad de CpGs que presentan: las islas CpG de alta densidad (HCP), las de baja densidad (LCP) y las de una densidad intermedia (ICP) (Weber et al., 2007). Aparentemente ésta clasificación de islas CpGs tiene una repercusión directa en los mecanismos epigenéticos involucrados en el silenciamiento de los promotores génicos embebidos en ellas (ver introducción general). De manera interesante, en el laboratorio se han desarrollado estudios de silenciamiento epigenético de dos genes supresores de tumores cuyos promotores corresponden a islas CpGs con características distintas. El promotor del gen de Retinoblastoma puede ser catalogado como una isla CpG de alta densidad (HCP) dado que contiene 27 CpGs distribuidos en los 400 pb del promotor mínimo de este gen; mientras que el promotor del gen *p53* humano presenta una isla CpG intermedia (ICP), la cual contiene 16 CpG en el promotor mínimo del gen dentro de una región de 350 pb (ver Figura 44A). En lo particular, estamos interesados en conocer las diferencias de la metilación incorporada *in vitro* en dos promotores asociados a islas CpG con características distintas.

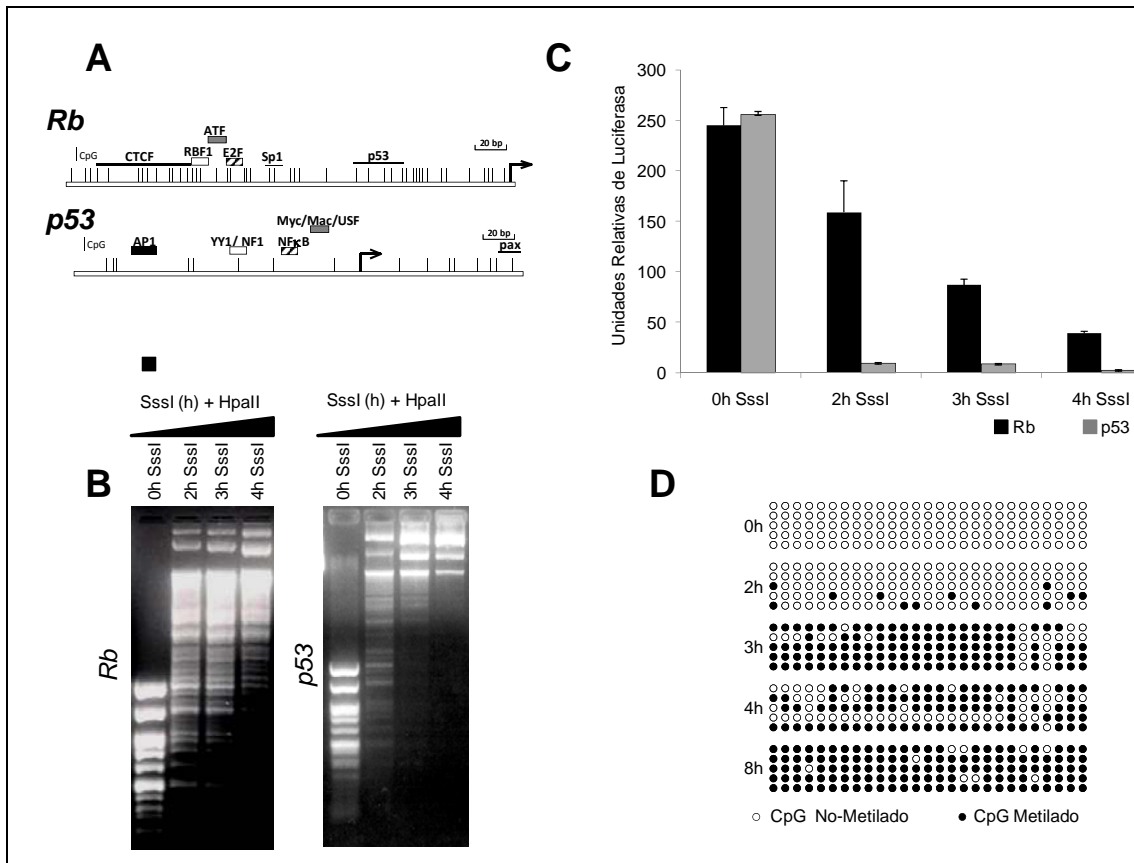
## OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto de la metilación *in vitro* sobre los promotores de genes supresores de tumores *Rb* y *p53* que presentan islas CpGs con características distintas.

Para el desarrollo de esta parte del proyecto se construyeron dos plásmidos: uno de ellos contiene al promotor mínimo de *Rb* (pGL*Rb*) (De-la-Rosa-Velázquez, datos no publicados) y otro al promotor de *p53* (pGL3*p53*) (Figura 44A). Estos plásmidos contienen al gen de la Luciferasa (*Luc*) como gen reportero. Con el fin de conocer el efecto de la metilación del ADN sobre dos estos promotores asociados a distintos tipos de islas CpGs procedimos a metilar *in vitro* a los plásmidos pGL*Rb* y pGL3*p53* a diferentes tiempos (0, 2, 3 y 4 horas de metilación *in vitro* del ADN; Figura 44). Para ello, se utilizó a la metilasa SssI. Esta enzima tiene la capacidad de agregar un grupo metilo en el dinucleótido 5'-C<sup>m</sup>pG-3'. Con el fin de corroborar la metilación de los plásmidos, el ADN plasmídico fue digerido con la enzima metilo-sensible HpaII, en donde, a mayor densidad de metilación del ADN menor cantidad de corte por parte de la enzima (Figura 44B). Los datos demostraron que a mayor tiempo de incubación con la enzima SssI se presenta un mayor número de dinucleótidos CpGs metilados (Figura 44B). Una vez corroborada la metilación de los plásmidos estos fueron transfectados de manera transitoria en células HeLa y 48 horas post-transfección se evaluó la actividad de Luciferasa. Los resultados mostraron que para el promotor de *Rb* existe un comportamiento inversamente proporcional entre la actividad de Luciferasa y el grado de metilación del plásmido, es decir, que a mayores tiempos de incubación con la metilasa SssI menor actividad del gen reportero. De manera interesante, para el caso del

promotor de *p53*, la actividad de *Luc* se abate en su totalidad al usar un plásmido que fue metilado *in vitro* durante dos horas (Figura 44C). Estos datos sugieren diferencias en la sensibilidad de los promotores con relación a la metilación del ADN, siendo el *p53* el promotor mucho más sensible, *in vitro*, a su silenciamiento por metilación del ADN a pesar de tener una menor densidad de dinucleótidos CpGs (Figura 44C). Por medio de la técnica de bisulfito de sodio y secuenciación se evaluó el estado de metilación del ADN en los distintos tiempos de incubación con la metilasa *SssI* sobre el promotor de *Rb* (Figura 44D). La secuenciación de las muestras transformadas del promotor de *Rb* sugiere que tiene mayor capacidad de contender en contra de la metilación del ADN debido a que incluso después de tres 3 horas de incubación con la metilasa y presentar más de un 90% de metilación éste mantiene cierta actividad del gen reportero (Figura 44D).



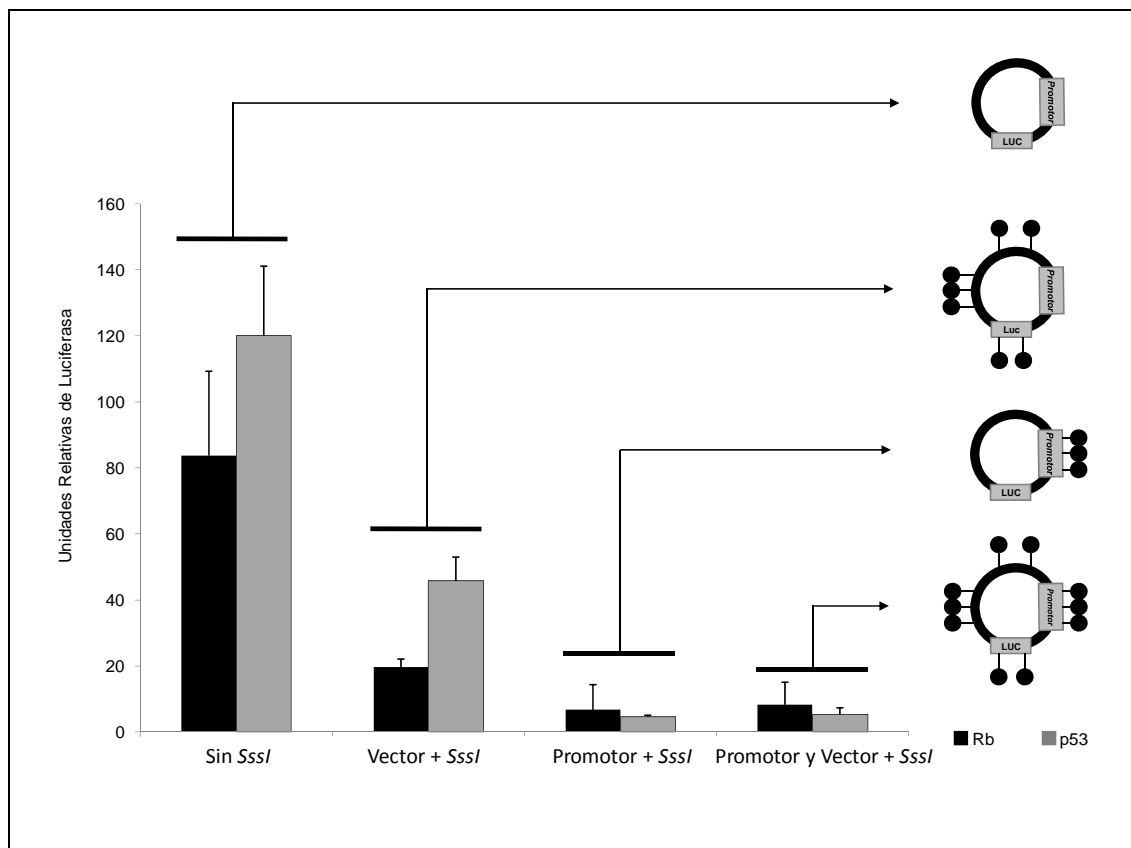


**Figura 44.** Efecto de la metilación del ADN *in vitro* sobre los promotores de los genes *Rb* y *p53*. **A-** Esquemas de los promotores de los genes *Rb* y *p53* donde cada una de las rayas verticales representan a cada uno de los dinucleótidos CpG presentes en cada uno de ellos. **B-** Evaluación del efecto de la metilasa SssI sobre los plásmidos pGL*Rb* y pGL3*p53* mediante la digestión con la enzima metilo-sensible HpaII. **C-** Efecto de la metilación del ADN sobre la actividad de los promotores *Rb* y *p53* evaluado por medio de la cuantificación del gen reportero Luciferasa (*Luc*). Los plásmidos fueron transfectados transitoriamente en células HeLa. **D-** Evaluación por bisulfito de sodio y secuenciación del estado de la metilación del ADN sobre el promotor *Rb* del ensayo de transfección transitoria. Los círculos negros indican metilación del ADN de un CpG y los blancos ausencia de metilación del ADN.

El hecho de que todo el plásmido estuviera siendo metilado en el ensayo anterior nos planteo la incertidumbre de que las diferencias observadas entre los promotores de *Rb* y *p53* se debía a que la metilación en el resto del plásmido pudiera alterar la actividad de los promotores sobre el gen reportero Luciferasa ó incluso al propio gen reportero.

Con el fin de abordar esta pregunta decidimos metilar diferencialmente tanto la región promotora y de manera independiente al vector. Una vez realizada la metilación *in vitro*, se llevó a cabo una ligación de manera

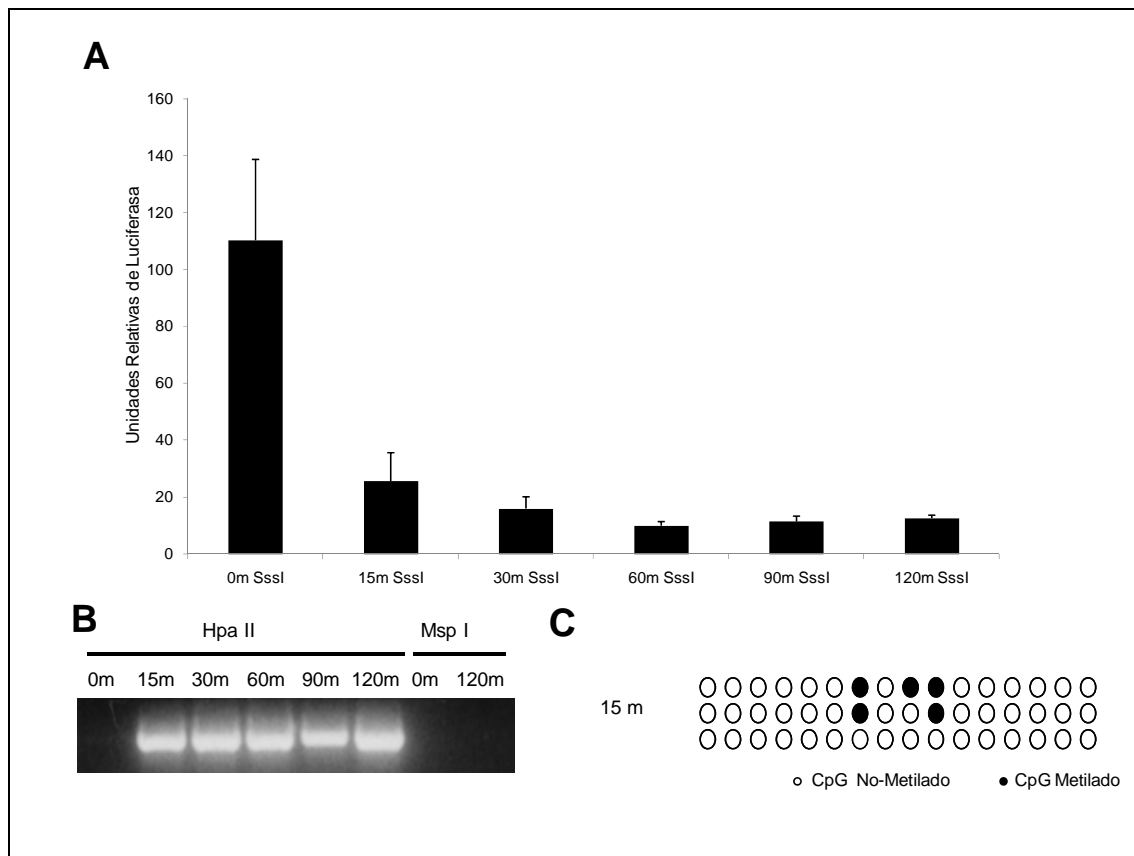
direccional de ambos vectores (pGLRb y pGL3p53), respectivamente, para finalmente ser transfectados transitoriamente en células HeLa (Figura 45).



**Figura 45.** Efecto de la metilación del ADN *in vitro* de manera diferencial del plásmido. Para ello se metiló los promotores y el vector durante ocho horas utilizando a la metilasa SssI, posteriormente estos fueron ligados y directamente transfectados transitoriamente en células HeLa.

Los resultados obtenidos demuestran que la metilación del promotor es capaz de silenciar epigenéticamente de manera específica a ambos promotores. A su vez, la metilación del vector causa una disminución de la actividad del gen reportero sin ser tan notoria como la determinada para el caso en el cual el promotor fue metilado *in vitro* exclusivamente. De igual forma, los datos de metilación *in vitro* del ADN a tiempos largos postulan que las diferencias de silenciamiento entre ambos promotores (*Rb* y *p53*) pudieran deberse en las características inherentes de sus promotores. En particular, la drástica disminución de la expresión del gen reportero en *p53* a las dos horas

de incubación con la metilasa podría deberse a la metilación particular de alguno de los CpG contenidos en la secuencia de su promotor. Por ello, decidimos evaluar la sensibilidad del promotor de *p53* en contra de la metilación del ADN, a tiempos cortos de incubación. Se decidió metilar únicamente al promotor de *p53* a 15, 30, 60, 90 y 120 minutos, respectivamente (Figura 46). Posteriormente los plásmidos fueron transfectados transitoriamente en células HeLa (Figura 46A). Los resultados muestran que desde los 15 minutos de incubación con la metilasa *SssI* se observa una disminución dramática en la actividad del gen reportero. Con el fin de corroborar que efectivamente la metilasa tiene actividad a estos tiempos de metilación, una parte de la reacción fue digerida con la enzima metilo-sensible *HpaII* y posteriormente se procedió a realizar una reacción de PCR utilizando a los oligonucleótidos sintéticos de la región promotora del *p53* (Figura 46B). La amplificación de un templado en la reacción de PCR sugiere que el promotor del gen se encuentra metilado en cada uno de los tiempos experimentales. Como control de la reacción se utilizó al isoesquizómero de *HpaII* (*MspI*) la cual no es metilo-sensible (Figura 46B). Con todos estos datos nos concentramos en determinar el estado de metilación del ADN en cada uno de los 17 CpGs presentes en el promotor del gen a 15 minutos de incubación con la metilasa (Figura 46C).



**Figura 46.** Efecto de la metilación *in vitro* a tiempos cortos de incubación con la metilasa *SssI*. **A-** La región promotora *p53* se metiló a 15, 30, 60, 90 y 120 minutos, posteriormente se ligó y transfectó transitoriamente en células HeLa. **B-** Una porción de la reacción de metilación fue diferida con la enzima metilo-sensible *HpaII* y con su isoesquizómero *MspI* posteriormente se realizó una reacción de PCR utilizando a los oligonucleótidos sintéticos de la región promotor de *p53*. **C-** Evaluación por bisulfito de sodio y secuenciación del estado de la metilación del ADN sobre el plasmido que contenía al promotor *p53* incubado 15 minutos con la metilasa *SssI*. Los círculos negros indican metilación del ADN de un CpG y los blancos ausencia de metilación del ADN.

Estos datos sugieren que con tan solo el 3% de metilación del ADN sobre el promotor del gen conlleva a una disminución importante de la expresión del reportero. Por lo tanto, el promotor de *p53* es más sensible a ser silenciado por la metilación del ADN que el promotor de *Rb*, a pesar de tener una densidad baja de dinucleótidos CpGs. Una posible interpretación pudiera tener que ver con la metilación de algún CpG en el promotor del gen interfiera con la unión de algún factor transcripcional indispensable para la correcta actividad de este elemento de control.

En resumen estos datos generados *in vitro* sugieren fuertemente que la composición de cada tipo de isla CpG puede ser crítica para su silenciamiento por metilación del ADN.

## **PERSPECTIVAS.**

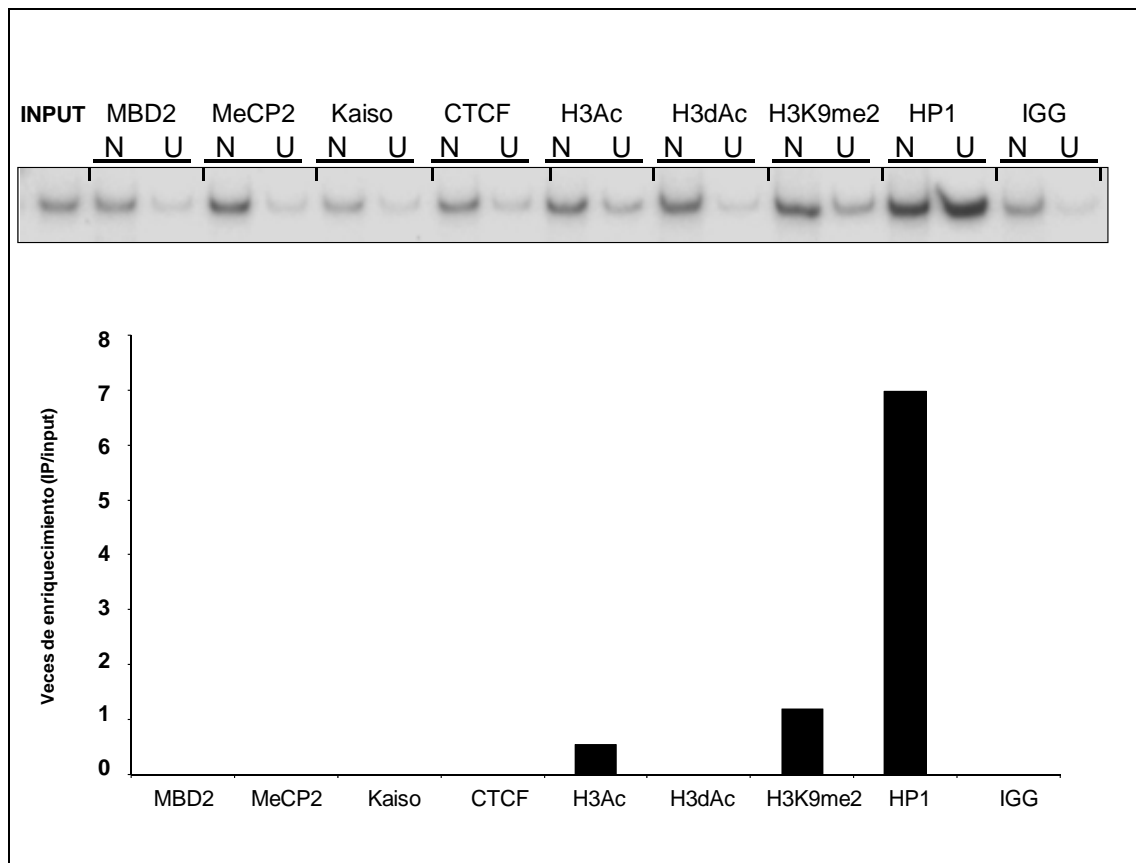
Con el fin de concretar parte del proyecto es necesario analizar el efecto de metilación a tiempos cortos sobre el promotor del gen de retinoblastoma, de igual forma realizar el análisis de bisulfito de sodio y secuenciación, con el fin de determinar cuáles pudieran ser los principales CpG metilados a tiempos cortos.

### **Anexo 3-**

#### **Presencia de la proteína HP1 en el promotor del gen *p53* humano en linfocitos de sangre periférica.**

En la actualidad se carece de un estudio que describa las modificaciones epigenéticas presentes en el promotor endógeno del gen *p53* humano en células no transformadas. Por ello nos enfocamos en estudiar el tipo de marcas epigenéticas presentes en dicho promotor. Utilizamos como sistema experimental compuesto por linfocitos de sangre periférica provenientes de dos individuos sanos, donde se llevó a cabo un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). En él, observamos un enriquecimiento de la histona H3 dimetilada en la lisina 9 (H3K9me2) y sorprendentemente a la proteína de heterocromatina 1 (HP1) (Figura 47). Este resultado sugiere, una vía por la cual H3K9me2 y la unión de la proteína de HP1 son en parte responsables, de modular epigenéticamente y de manera negativa la expresión del gen *p53* en un contexto celular normal. Esto abre un campo de estudio inédito, debido a que nuestros resultados plantean por primera vez, que ciertas marcas represivas de las histonas, pudieran estar modulando negativamente la conformación cromatínica asociada al promotor *p53* y por ende su expresión, y que de forma regulada deben ser revertidas. Por otra parte, esta observación es consistente con los datos obtenidos en las líneas celulares tumorales de origen epitelial y fibroblastos normales (ver Figura 13). En la actualidad han descrito desmetilasas de histonas, denominadas “Jumonji” las cuales tienen la capacidad de revertir el estado de metilación de múltiples marcas en las histonas, incluida a la H3K9me2

(Takeuchi et al., 2006). Uno de tantos modelos posibles, contempla que la expresión del gen, dirigida por su promotor en condiciones normales es prácticamente nula, por lo cual las desmetilasas de histonas pudieran estar involucradas en la regulación positiva del gen vinculada a una respuesta rápida a distintos tipos de estímulos. Por lo tanto, el estudio de las Jumonji sobre la regulación del promotor del gen *p53* humano en células normales sería de gran relevancia en un futuro próximo.



**Figura 47.** Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) sobre el promotor *p53* en linfocitos de sangre periférica humana. Para este estudio se emplearon anticuerpos que reconocen a proteínas de unión al ADN metilado como MBD2, MeCP2 y Kaiso, como también de modificaciones en las histonas. En este resultado se observa la presencia de la histona H3 lisina 9 dimetilada (H3K9me2) y la proteína HP1.

## **PERSPECTIVAS.**

Las recientes publicaciones relacionadas con la función de enzimas desmetilantes de histonas “Jumonji” sugieren que podrían ser blanco de las vías de *Rb* y *p53* (Pfau et al., 2008). Debido a que nuestros datos sugieren la presencia de HP1 en células quiescentes, sería de gran relevancia concentrarse en células inducidas evaluando así presencia de estas marcas represivas como también de las desmetilasas de histonas determinando así su efecto sobre la expresión del gen. Este tipo de experimentos también podrían llevarse a cabo en condiciones de estrés celular.



#### **Anexo 4-**

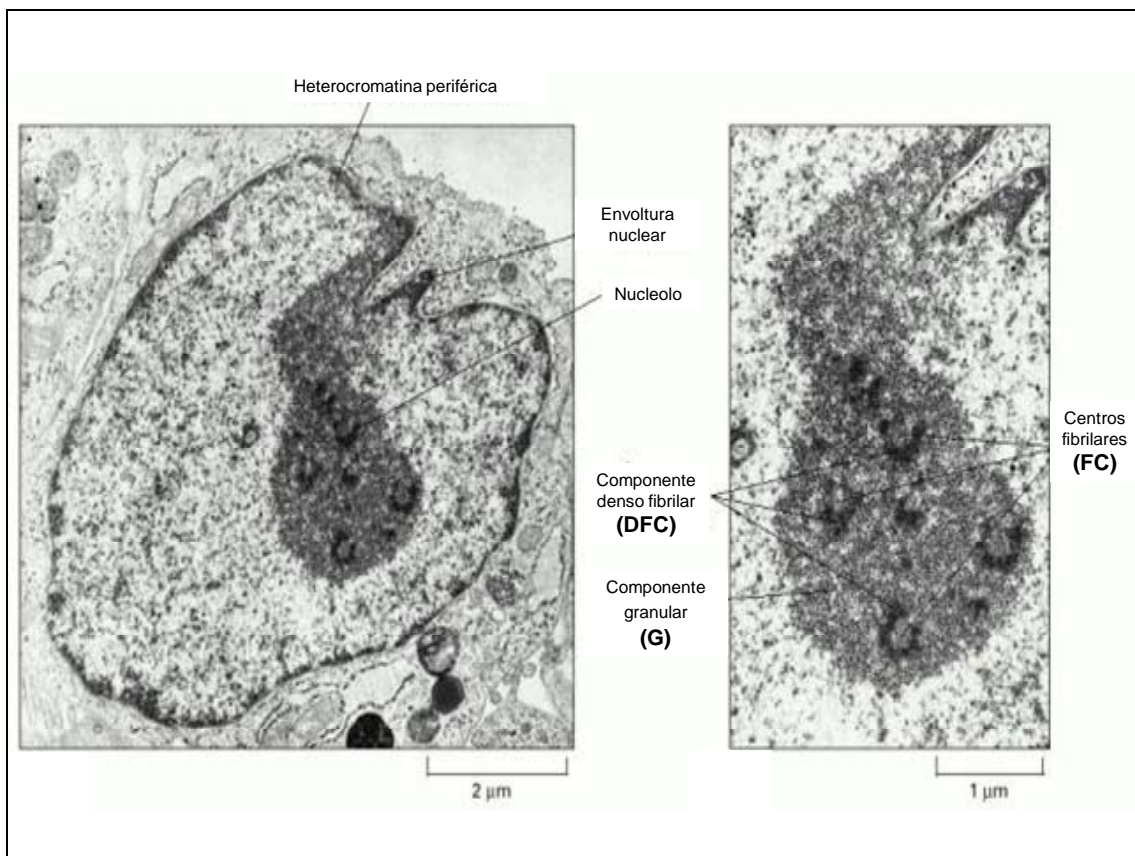
#### **Defectos estructurales del nucléolo causados por la ausencia del factor nuclear CTCF.**

El nucléolo es una estructura visible en el núcleo, la cual tiene como función principal la biogénesis ribosomal. También se ha visto involucrado con otras funciones como la retención de moléculas relacionadas al ciclo celular y la apoptosis, entre otras (Hernandez-Verdun, 2006). En el nucléolo se lleva a cabo la transcripción de los genes ribosomales (rDNA), procesamiento del RNA ribosomal (rRNA) 47S y el inicio del ensamblaje de las proteínas ribosomales como el RNA 5S, formando así a la subunidades pequeñas y grandes del pre-ribosoma. El nucléolo puede variar en tamaño y número dependiendo de la actividad, estado de proliferación o diferenciación celular (Hernandez-Verdun, 2006).

#### **Organización nucleolar.**

Existen tres componentes nucleolares visibles por microscopía electrónica (Figura 48). Los centros fibrilares (FC) quienes están parcial o completamente rodeados por una zona electrón densa conocida como componente fibrilar denso (DFC). Tanto los FC como los DFC están embebidos en un componente granular (GC), mayoritariamente compuesto por gránulos de 15-20 nm de diámetro (Junéra et al., 1995). Los FC pueden variar en tamaño y número y son inversamente proporcionales entre el tamaño y número. El transcrito nascente proveniente de los genes ribosomales se localiza en la unión entre la región del FC y del DFC acumulándose el transcrito en esta última (Junéra et al., 1995).

El nucléolo a su vez está compuesto de múltiples proteínas como la fibrilarina y la nucleolina que participan en las etapas tempranas del procesamiento del RNA ribosomal (RNAr). Dichas proteínas se localizan a lo largo del DFC con el RNA pequeño no-codificante (snoRNA) U3, mientras que las proteínas B23 y Nop52 se localizan en GC; estas participan en las etapas intermedias y tardías de la biogénesis ribosomal (Puvion-Dutilleul et al., 1991).



**Figura 48.** Estructura del nucléolo. Micrografía electrónica donde se muestran los tres componentes principales del nucléolo como los centros fibrilares (**FC**), los componentes fibrilares densos (**DFC**), y los componentes granulares (**G**).

A su vez, por medio de la microscopía electrónica se ha logrado observar una cromatina condensada en el nucléolo, la cual no llega a ser tan densa como en el núcleo, lo cual mediante tinciones específicas del DNA (como DAPI) no se logra evidenciar (Hernandez-Verdun, 2006).

### **Ensamblaje nucleolar al final de la mitosis.**

En eucariontes, el nucléolo se ensambla durante la transición de mitosis/interfase. Este ensamblaje requiere a su vez la reactivación de la maquinaria de transcripción del ADNr (Sirri et al., 2008). Las proteínas nucleolares encargadas en la transcripción del RNAr son la polimerasa I y sus factores transcripcionales asociados, mientras que las proteínas B23, Nop52, nucleolina y Rpp29 tienen que ver con el procesamiento (Hernandez-Verdun, 2006). Las proteínas involucradas en el procesamiento del pre-rRNA abandonan el nucléolo durante la profase y se localizan mayoritariamente en la periferia de los cromosomas durante la mitosis. Se ha demostrado que muchas de las proteínas nucleolares son altamente dinámicas, asociándose y disociándose en un continuo intercambio con el nucleoplasma (Sirri et al., 2008). Durante la anafase, las proteínas involucradas en el procesamiento temprano y tardío (fibrilarina, Bop1, B23, y Nop52) se distribuyen homogéneamente alrededor de los cromosomas. Mientras que en la telofase y la fase G1 temprana ocurre una translocación desde la periferia cromosómica hacia los sitios de transcripción, para posteriormente concentrarse en *foci* específicos conocidos como cuerpos prenucleolares (PNB). Los PNB son estructuras discretas fibrogranulares visibles por microscopía electrónica. La formación de PNB es un fenómeno que ocurre durante el ciclo celular y el desarrollo. Se ha observado que la fibrilarina es una de las proteínas que primero abandona a los PNB y es reclutada a los sitios de transcripción, mientras que la mayoría de las proteínas se mantienen en los PNBs (Hernandez-Verdun, 2006).

## **El nucléolo y el cáncer.**

La morfología y el número de nucléolos dependen de la actividad celular. Especialmente en cáncer, la hipertrofia del nucléolo es uno de los mayores cambios citológicos observables en células cancerosas. En cáncer el nucléolo puede variar en tamaño, forma y número, ocurriendo frecuentemente la hipertrofia nucleolar y la irregularidad en su forma en células cancerosas (Derenzini et al., 2002). Mediante la técnica de impregnación argéntica o AgNOR es posible evidenciar la distribución de proteínas nucleolares en tejidos malignos reconociendo así defectos en las regiones organizadoras nucleolares (NOR) (Treré et al., 2004). Esta técnica tiene la capacidad de resaltar a dos de los componentes principales del nucléolo: la nucleolina y las proteínas B23 (Derenzini et al., 2002). La cantidad de impregnación del AgNOR también ha sido utilizada para conocer el estado de proliferación celular de células cancerosas (Derenzini et al., 2002). Donde incluso se ha utilizado como un indicador del pronóstico de distintas neoplasias, evidenciando una relación entre la función del núcleo y la proliferación del cáncer (Mojgan et al., 2008).

## **El factor CTCF y su relación con el nucléolo.**

Hoy en día es bien sabido que el factor CTCF está estrechamente ligado en la organización nuclear; se han observado interacciones dinámicas entre CTCF y las fibras de cromatina en el contexto de la arquitectura nuclear, lo cual repercute en múltiples funciones genómicas (Ohlsson et al., 2010).

Una de las interrogantes actuales es el conocer si el factor CTCF también tiene implicaciones en la estructura nucleolar, lo cual podría tener un impacto importante en la biogénesis de éste componente celular.

Ensayos *in vivo* han demostrado que el factor CTCF co-purifica y co-localiza con proteínas nucleolares como la nucleofosmina (Yusufzai et al., 2004). Interesantemente, CTCF presenta una distribución dependiente del ciclo celular (Zhang et al, 2004). En células en interfase la localización de CTCF es nuclear, donde mayoritariamente se excluye del nucléolo. Durante la mitosis CTCF se ha visto asociado a centrómeros, especialmente durante la metafase y anafase. En la telofase CTCF se disocia de los centrómeros y se re-localiza principalmente en el núcleo (Zhang et al., 2004). A la par existen reportes en donde se ha observado a CTCF en el nucléolo en diferentes modelos experimentales. Como ejemplo de ello se ha descrito la translocación de CTCF del núcleo hacia el nucléolo durante la diferenciación de la línea celular mielóide K562 y en el proceso de apoptosis en la línea celular mamaria MCF7 (Torrano et al., 2006; Kantidze et al., 2007; Liu et al., 2008). La localización nucleolar ha sido asociada con el arresto del ciclo celular. Interesantemente el CTCF presente en el nucléolo se encuentra post-traduccionalmente modificado por (ADP-ribosil)ación, modificación post-traducciona que tiene la capacidad de inhibir la transcripción nucleolar (Torrano et al., 2006). Aparentemente un dominio central de los dedos de zinc es el responsable de translocar a CTCF hacia el nucléolo (Torrano et al., 2006). Todos estos antecedentes nos hacen suponer que la presencia de CTCF en el nucléolo es importante para distintos procesos celulares como el arresto del ciclo celular. De manera paralela existen evidencias que sugieren una función estructural para el factor CTCF a nivel del núcleo (Guelen et al., 2008; Cuddapah et al., 2009), pero hasta ahora se desconoce su papel en la estructura y función del nucléolo.

## **OBJETIVO GENERAL.**

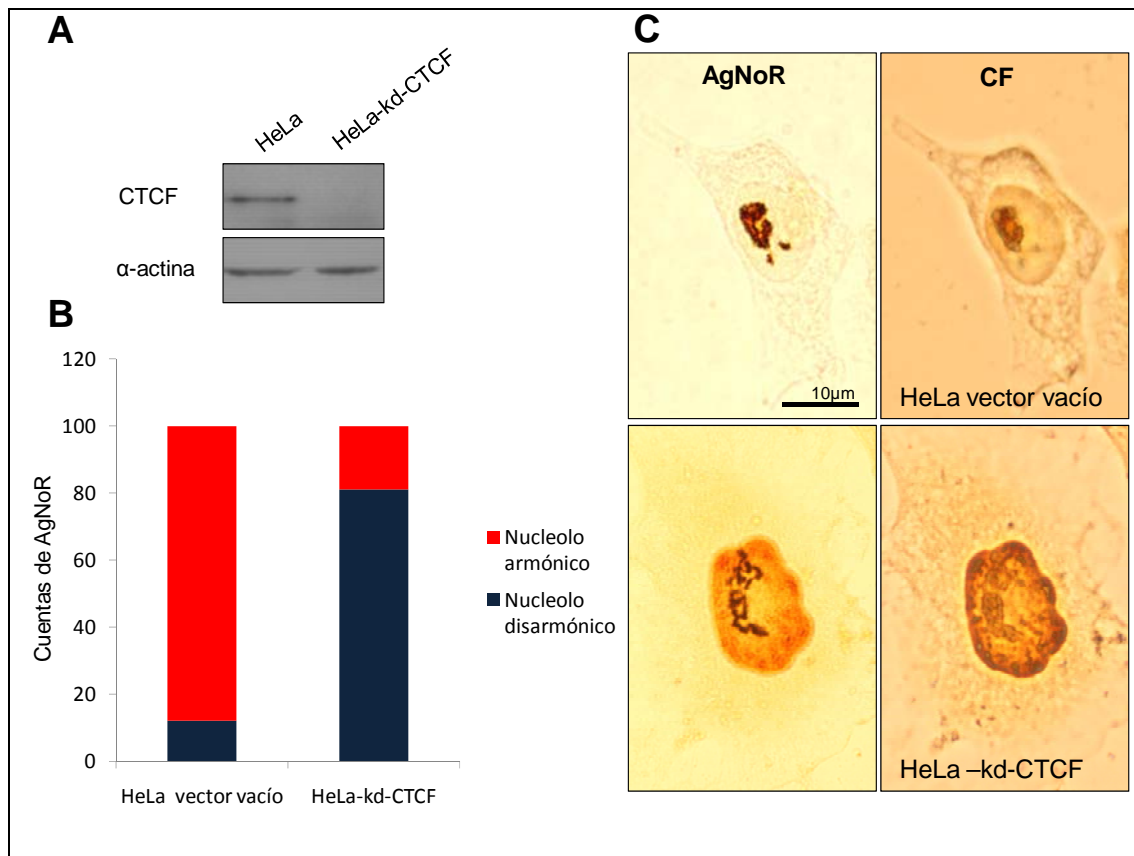
Determinar el papel de CTCF en la formación y organización del nucleolar.

## **OBJETIVO PARTICULAR.**

Evaluar las repercusiones estructurales del nucléolo en células deficientes a CTCF (HeLa-kd-CTCF).

## **RESULTADOS.**

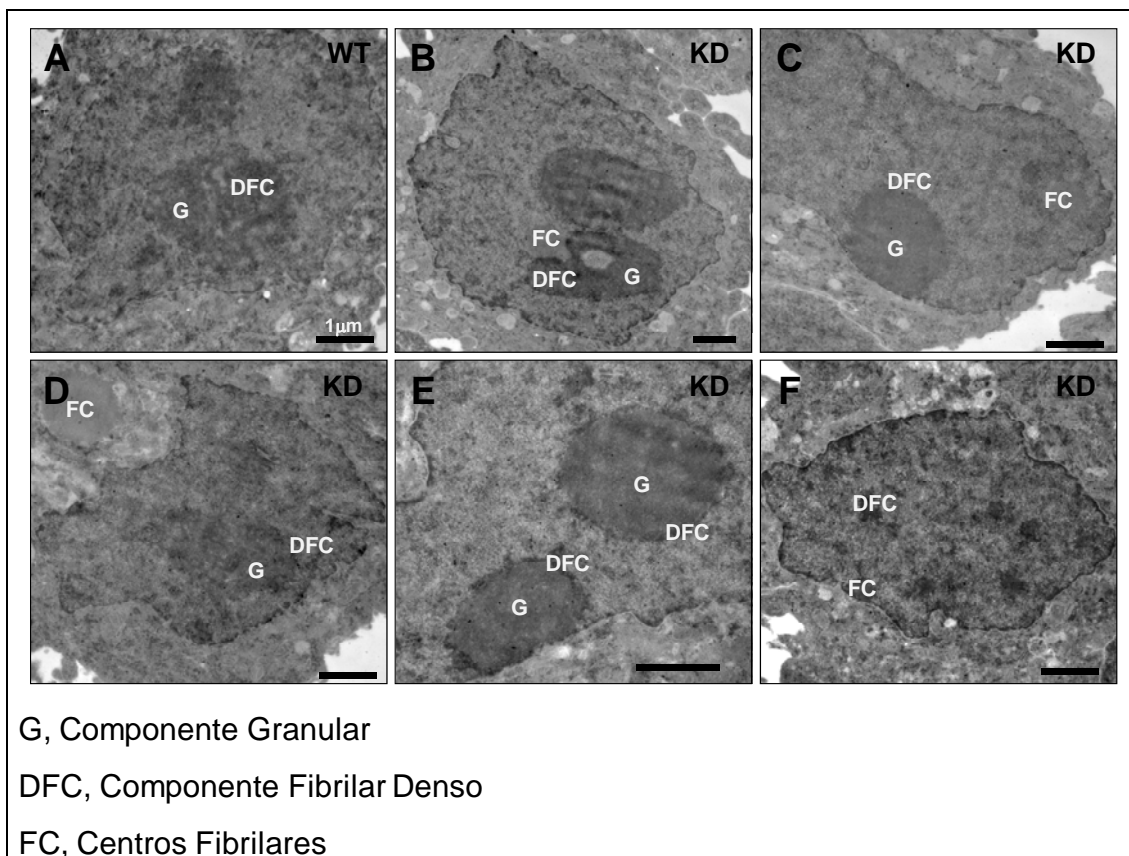
Con el fin de evaluar la posible contribución de CTCF sobre los organizadores nucleolares se utilizó la técnica de impregnación argéntica o AgNOR. Esta técnica permite estudiar a los componentes proteicos asociados a la región organizadora del nucléolo (NOR), como también el número, tamaño y armonía (forma normal) del nucléolo. Dicho ensayo se realizó en dos contextos celulares distintos, para ello se emplearon las líneas celulares previamente descritas HeLa y HeLa-kd-CTCF (Figura 21). En primera instancia se corroboró que las células a evaluar fueran deficientes a CTCF mediante el ensayo de Western blot (Figura 49A). Posteriormente mediante microscopio óptico se evaluó el estado de las proteínas pertenecientes a los organizadores nucleolares impregnadas en con la técnica de AgNOR, cien células fueron evaluadas para cada condición (HeLa y HeLa-kd-CTCF) (Figura 49B y C). Las células que presentaron una estructura normal de NOR se les denominó armónicas, mientras que aquella que presentaran una desorganización de los organizadores nucleolares se les denominó disarmónicas (como foto representativa ver la Figura 49C, panel inferior).



**Figura 49.** Evaluación del estado estructural de la región organizadora del nucléolo (NOR) mediante la impregnación argéntica AgNOR. **A-** Caracterización de la abundancia del factor nuclear CTCF en las células deficientes a CTCF (HeLa-kd-CTCF) comparadas con HeLa mediante Western blot. **B-** Grafica de la evaluación del estado estructural de los NOR, para ello se contaron 100 nucléolos celulares de cada una de las condiciones (Hela y HeLa-kd-CTCF), a los NOR con estructuras normales se les denominó armónicos, mientras aquellos que presentaban un des-arreglo estructural se les denominó disarmónicos. **C-** Ejemplificación de las células impregnadas por la técnica de AgNOR donde se puede apreciar que las células HeLa vector vacío presentan la región organizadora del nucléolo normal, mientras que en las HeLa-kd-CTCF (panel inferior) se puede apreciar la desorganización estructural del NOR. Estos datos fueron evaluados con campo claro y contraste de fases (CF). La línea representa un tamaño de 10  $\mu$ M.

Estos datos sugieren que la ausencia de CTCF causa una desorganización de las proteínas pertenecientes a los componentes nucleolares. Con el fin de conocer el grado y estructuras afectadas en el nucléolo se procedió a realizar micrografías electrónicas de ambos contextos celulares (Figura 50). En las células HeLa se pone en evidencia la presencia de dos de los tres principales componentes del nucléolo (Componente granular y componente fibrilar denso), mientras que en las células HeLa-kd-CTCF se

aprecian distintos grados de desorganización de los componentes nucleolares que van desde la deslocalización de los centros fibrilares (Figura 50B, B-D) hasta la desorganización generalizada de todos sus componentes (Figura 50E y F). Con base a estos datos decidimos determinar cuáles de los componentes de NOR se encontraban desorganizados; para ello realizamos la técnica de AgNOR a nivel ultra estructural.



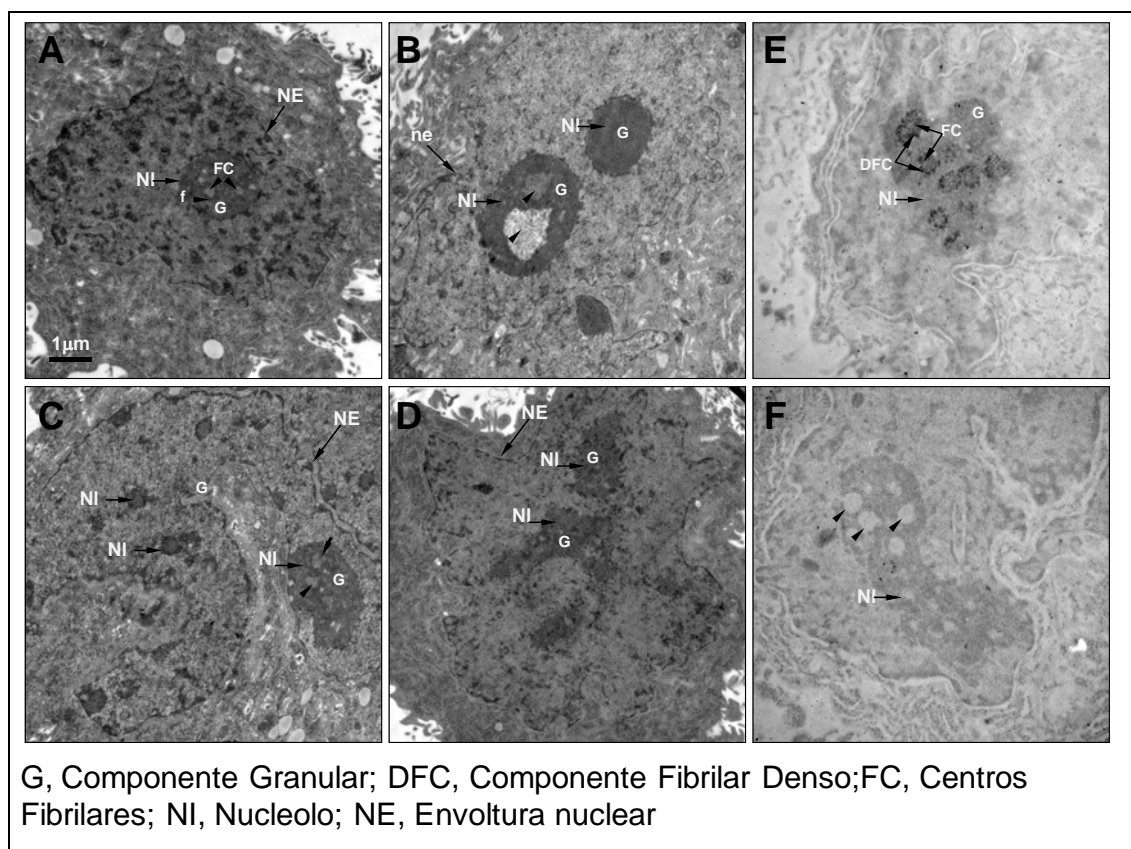
**Figura 50.** Análisis ultra estructural del nucléolo en células HeLa y células deficientes a CTCF HeLa-kd-CTCF. Estos datos fueron estudiados en cortes semi-finos evaluados con la técnica general de tetróxido de osmio. **A-** Micrografía del nucléolo de HeLa donde se aprecian dos de los tres componentes principales del nucléolo. **B, C, D, E y F-** Micrografía del nucléolo de HeLa deficiente a CTCF (HeLa-kd-CTCF), donde se distinguen diferentes grados de desorganización de los componentes nucleolares. La G: Componente Granular, DFC: Componente Fibrilar Denso, y la FC: Centros Fibrilares. La barra representa un tamaño de 1  $\mu$ m en todas las imágenes.

Para nuestra sorpresa las células deficientes a CTCF (HeLa-kd-CTCF) presentaban “hoyos” en las zonas perteneciente al componente granular y al fibrilar denso. Estos datos sugieren que la ausencia de CTCF induce la pérdida



o desorganización de las proteínas asociadas a alguno de estos componentes y por ende su estructura.

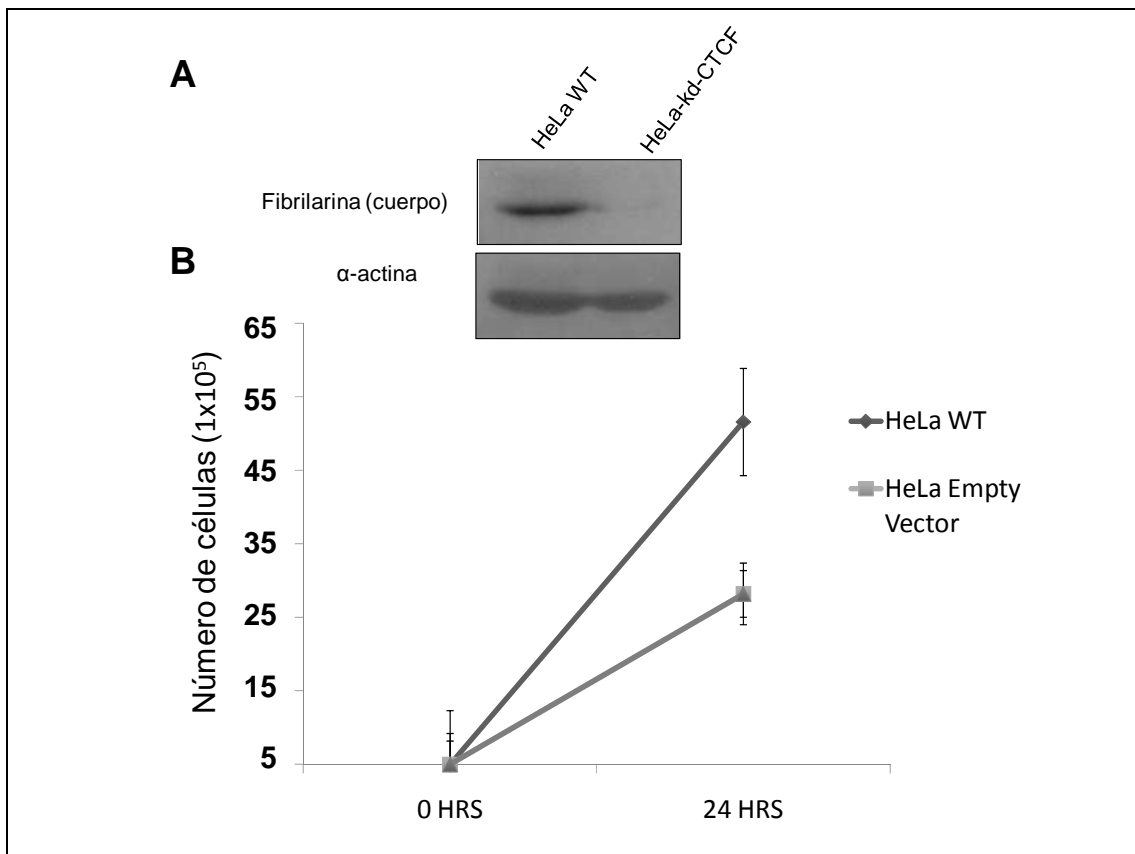
Por la literatura sabemos que al interior de los centros fibrilares se distribuye la fibrilarina, mientras que en los componentes granulares se distribuye mayoritariamente a la nucleofosmina y la proteína B23. Por medio de Western blot e inmunofluorescencias evaluamos la abundancia de fibrilarina en ambos contextos celulares (HeLa y HeLa-kd-CTCF ver Figura 52A y 53).



**Figura 51.** Ultra estructura del nucléolo en células HeLa y células deficientes a CTCF HeLa-kd-CTCF evaluado por la técnica de impregnación argéntica AgNOR. **A-** Micrografía del nucléolo de HeLa donde se aprecian los tres componentes principales del nucléolo señalado con flechas. **B-** Micrografía del nucléolo de células HeLa deficiente a CTCF (HeLa-kd-CTCF), donde se puede apreciar la presencia de “hoyos” (marcados con flechas) en el componente granular. **C-** Micrografía del nucléolo de HeLa deficiente a CTCF (HeLa-kd-CTCF), donde se puede apreciar la presencia de “hoyos” (marcados con flechas) en el componente granular también se puede observar pequeños fragmentos del nucléolo en el nucleoplasma. **D-** Micrografía del nucléolo de células HeLa deficientes a CTCF (HeLa-kd-CTCF), donde se aprecia una total disgregación de los componentes nucleolares (núcleolo disarmónico). **E-** Micrografía del nucléolo en células HeLa donde se observa el componente granular parcialmente contrastado, el componente fibrilar denso altamente contrastado y los centros fibrilares parcialmente contrastados. **F-** Micrografía del nucléolo de HeLa deficiente a CTCF (HeLa-kd-CTCF), donde se puede apreciar la presencia de “hoyos” (marcados con flechas) el componente granular está

parcialmente contrastado. La G: Componente Granular, DFC: Componente Fibrilar Denso, la FC: Centros Fibrilares, NI: nucléolo y NE: envoltura nuclear. La barra representa un tamaño de 1  $\mu$ M en todas las imágenes.

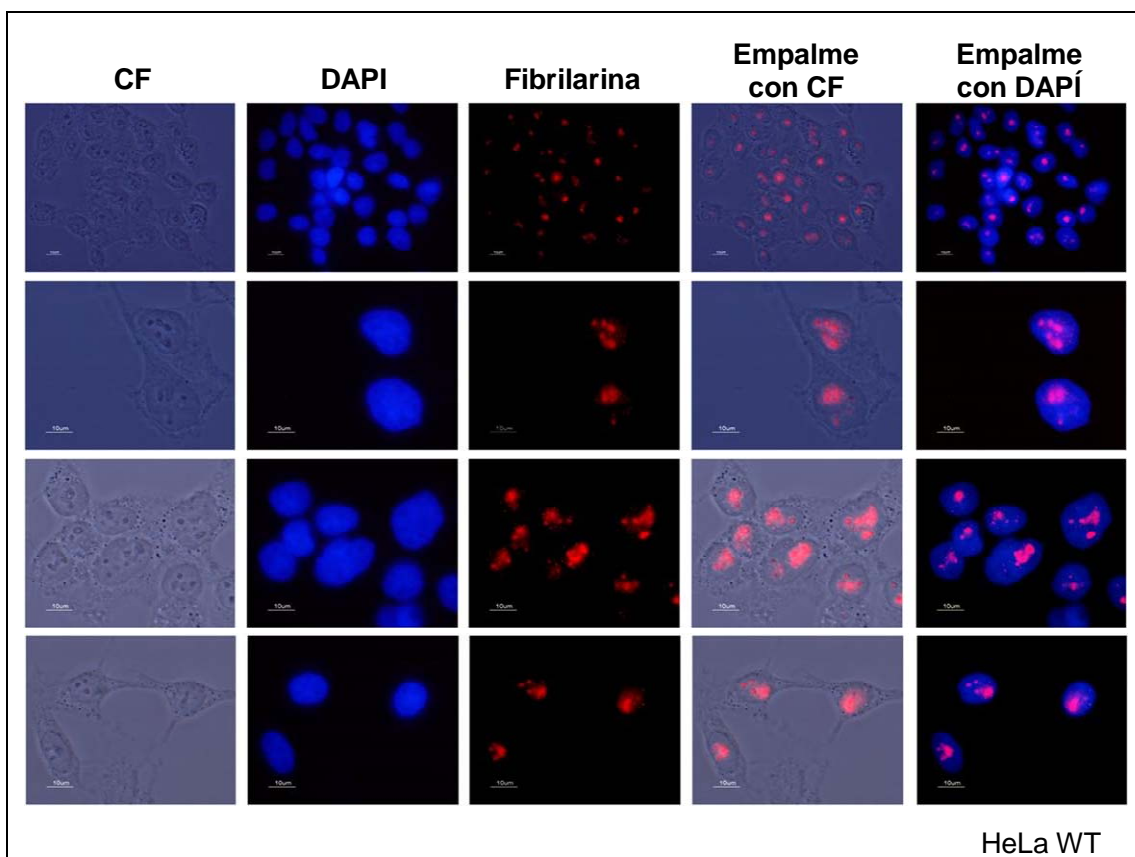
De manera importante logramos apreciar que en células deficientes a CTCF carecen de fibrilarina (Figura 52A). Estos datos sugieren que el factor CTCF puede estar involucrado en la transcripción o traducción de la fibrilarina y/o otros componentes del NOR.



**Figura 52.** Evaluación funcional de la ausencia de CTCF sobre los organizadores nucleolares y sobre el ciclo celular. **A-** Determinación de la abundancia de fibrilarina en células HeLa y células deficientes a CTCF (HeLa-kd-CTCF) por medio de Westen blot. Como control de carga se evaluó a la  $\alpha$ -actina. **B-** Evaluación del ciclo celular mediante “Doubling time” en células HeLa wt, HeLa transfectada establemente con el vector vacío y células deficientes a CTCF (HeLa-kd-CTCF).

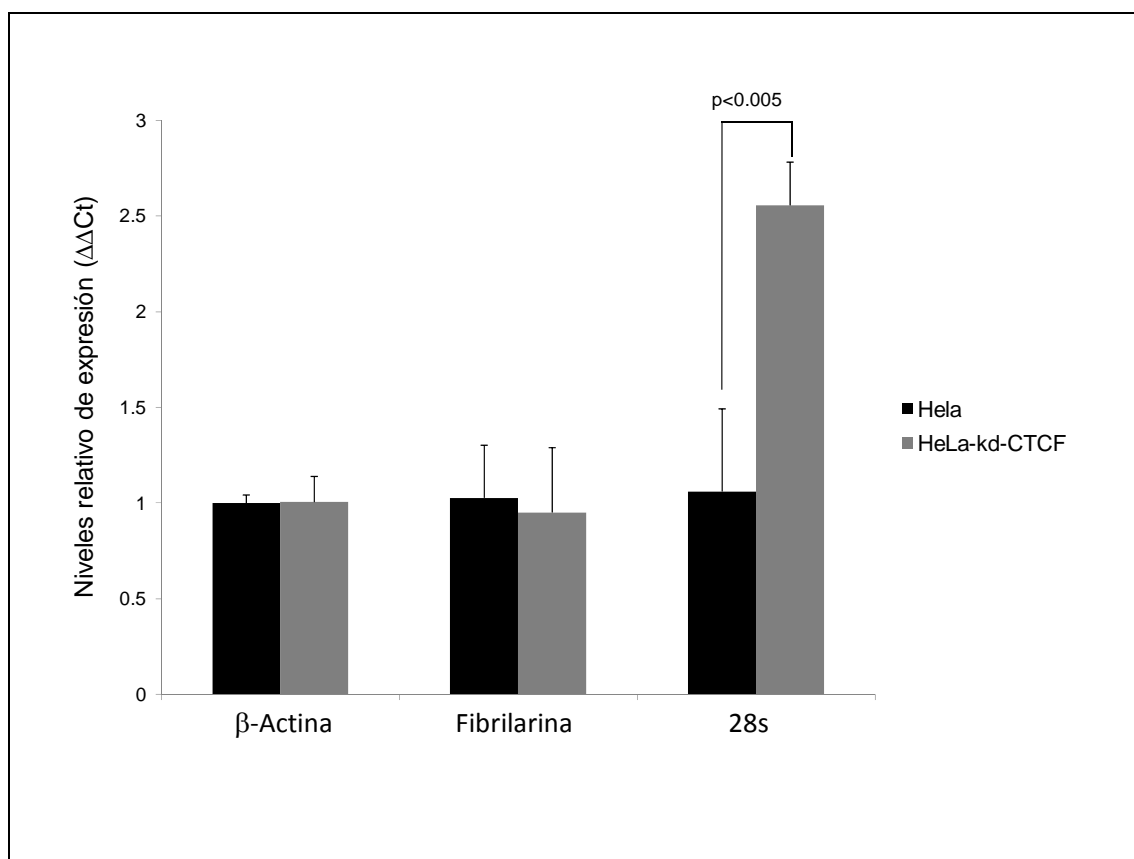
Especialmente la fibrilarina participa en el procesamiento temprano del RNAr, por lo cual su ausencia podría afectar la sobrevivida celular. Por esto, nos concentramos en determinar la tasa de división celular mediante un ensayo de

“doubling time” (Figura 52B). Para la realización de este ensayo se parte de un número determinado de células y se contabilizan a lo largo del tiempo. Los datos sugieren que las células cultivadas con el antibiótico de selección (Puromicina) que presentan tanto al shRNA dirigida contra CTCF, como el vector vacío tienen básicamente la misma tasa de división celular (Figura 52B). Como control del ensayo se evaluaron células HeLa que no contienen ningún tipo de vector y cultivadas en ausencia de selección. Estos datos apuntan a que la aparente ausencia de fibrilarina no afecta la división celular. Una de las posibilidades por las cuales las células puedan seguir dividiéndose es debido a que ésta son células transformadas, lo cual favorece *per se* su división celular.



**Figura 53.** Determinación de la abundancia y localización de Fibrilarina en células HeLa evaluado por inmunofluorescencias. En la imagen CF representa el contraste de fase, DAPI (4',6-diamidino-2-phenilindol) representa la tinción de ADN y la fibrilarina está evaluada por medio del fluoróforo Texas Red.

Con el fin de conocer el efecto biológico de la ausencia de CTCF sobre la expresión de genes asociados a la biogénesis ribosomal, se realizó una qRT-PCR. Evaluamos la expresión de fibrilarina y los rRNA 28s tanto en células HeLa, como en HeLa-kd-CTCF (Figura 54). En dicho ensayo constatamos que la ausencia de CTCF no afecta la expresión de fibrilarina, mientras que para el gen ribosomal 28s se aprecia un incremento en su expresión (Figura 54). Como control del ensayo se muestran las gráficas de amplificación de cada uno de los templados, como también las curvas de disociación de los oligonucleótidos. En dicha curva se observa el enriquecimiento de un solo templado, lo cual refleja la formación de un solo amplicón.



**Figura 54.** Evaluación de la expresión de genes asociados a la biogénesis ribosomal en un contexto deficiente a CTCF. qRT-PCR de  $\beta$  actina, fibrilarina y 28s en células HeLa y HeLa-kd-

CTCF. Los datos se realizaron por triplicado (dato evaluado por dos ensayos independientes) y fueron analizados por medio de la  $\Delta\Delta Ct$ .

Estos datos sugieren por un lado, que CTCF podría estar involucrado en la regulación negativa de la expresión de los rRNAs 28s (ver discusión).

## **DISCUSIÓN.**

El nucléolo es el resultado de la fusión de múltiples regiones organizadoras nucleolares (NORs), las cuales se localizan en los brazos cortos de los cromosomas acrocéntricos 12, 14, 15, 21 y 22. La formación del nucléolo representa a su vez, un prototipo de organización al interior del núcleo definiendo claramente territorios cromosómicos.

En los eucariontes, son cientos el número de copias correspondientes a los genes que codifican para los genes rRNAs tanto en un estado activo como constitutivamente silenciado, donde recientemente se ha sugerido que CTCF puede ser en parte responsable de su regulación a nivel transcripcional (Santoro, 2005). La transcripción de los genes ribosomales (rDNA) se establece durante el desarrollo, y está modulada por eventos epigenéticos, como las modificaciones post-traduccionales de las histonas y la metilación del ADN las cuales fomentan su silenciamiento transcripcional selectivo. Actualmente CTCF parece ser un factor importante en la biogénesis nucleolar, ya que existen evidencias que sugieren una estrecha interacción entre la PARP-1, CTCF y la proteína nucleolar nucleofosmina/B23. En particular se ha observado la distribución de CTCF en la región periférica del nucléolo (Yusufzai et al., 2004). Además, Torrano y colaboradores han sugerido que CTCF poli(ADP-ribosil)ado puede reprimir la transcripción de genes ribosomales, debido que un tratamiento con el inhibidor de la PARP, conocido como 3-

aminobenzamide (3-ABA), induce una reactivación de la expresión de dichos genes (Torrano et al., 2006). Todos estos antecedentes sugieren que CTCF juega un papel relevante en la expresión de los genes ribosomales. Dentro de nuestro estudio demostramos que la ausencia de CTCF, inducido por un RNAi promueve una mayor expresión del gen 28s (ver Figura 54). A su vez, la ausencia de dicho factor conlleva a una desorganización en las regiones organizadoras nucleolares o NOR. En particular, micrográficas del nucléolo en células HeLa-kd-CTCF demuestran la presencias de “hoyos” en el componente granular y una desorganización de los componentes denso fibrilar y centros fibrilares. Estos datos novedosos sugieren que CTCF no solo está involucrado en la actividad génica de los genes ribosomales, sino que también juega un papel importante a nivel estructural.

En conclusión, hemos demostrado que CTCF es un elemento importante en la biogénesis ribosomal, y que su ausencia deriva no solo en una actividad anormal de la expresión propia de los genes ribosomales, sino que también a nivel ultra estructural del nucleolo.

## **PERSPECTIVAS.**

Los datos presentados de esta parte del proyecto representan un aspecto novedoso ligado a la biología del factor multi-funcional CTCF. Dentro de las perspectivas complementamos el analizar más componentes del NOR como nucleofosmina, B23 entre otros y determinar con mayor detalle los cambios estructurales que sufre el nucléolo en ausencia del factor CTCF. Se podría analizar la transcripción de estos genes, como también analizar presencia *in vivo* de CTCF en los promotores de los genes del NOR y su posible vínculo con la estructura cromatínica de los genes ribosomales. Otro

aspecto que debe ser analizado a corto plazo tiene que ver con posibles defectos en la maquinaria traduccional derivadas del abatimiento en los niveles de CTCF y por ende, defectos en la organogénesis del nucléolo.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## LISTA DE OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS

Nombre y función	OLIGONUCLEÓTIDOS
<b>Clonación del promotor mínimo de p53</b>	
P53prom F	5' CGGGATCCTCACAGCTCTGGCTTGCAGA 3'
P53prom R	5' CGGGATCCCCACTCACCCCCAACTCGC 3'
<b>Análisis de expresión por RT-PCR</b>	
<b>Para la expresión de p53</b>	
p53chF	5' TTAGTATCTACGGCACCAGGTC 3'.
p53chR	5' CAAGTTCAGTCAGGAGCTTACC 3'.
GAPDHgF	5' GGAGTCCACTGGCGTCTTC 3'
GAPDHgR	5' GGTTCACACCCATGACGAAC 3'
<b>Para la expresión de Rb1 (exón 27 del gen).</b>	
RTRb-F	5'- AAGTACCCATCTAGTACT -3'
RTRb-R	5'- AAGTTACAGCATCTCTAAA -3'
<b>Para la expresión de los RNA ribosomal 28s.</b>	
rDNA1	5' CGGACCAAGGAGTCTAACAC 3'
rDNA2	5' CTTCGGAGGGAACCACTA3'
<b>Inmunoprecipitación de la cromatina</b>	
<b>Región del promotor de p53 humano</b>	
p53chF	5' TTAGTATCTACGGCACCAGGTC 3'.
p53chR	5' CAAGTTCAGTCAGGAGCTTACC 3'.
<b>Región del sitio de unión a CTCF</b>	
CTCF-P53 CHIP F	5' CACCTTCCGATTGGGCCGC 3'
CTCF-P53 CHIP R	5' AGTGCCTATATCAGTCTGGG 3'
<b>Para normalización de PCR duplex</b>	
<b>Marcas Abiertas</b>	
MYOD1,2 Fwr	5' TAGCCTGTTTTGGAAGTGTCCGG
MYOD1 Rev	5' CTGTCTCGTTCCGGGGGTAATT 3'
MYOD2 Rev	5' ACAGTCACCAAGGGGCGCAAATT 3'
MYOD3 Fwr	5' AGGAAGTGAGGAAGTTAGGGCCG 3'
MYOD3 Rev	5' CAAAACAGGCTACCCCAAGTACA 3'
<b>Marcas Cerradas</b>	
β-Actin human Fwr	5' CGTACCACTGGCATCGTG 3'
β-Actin human Rev	5' GGTAGTCAGTCAGGTCCC 3'
<b>Análisis de Metilación del ADN</b>	
<b>Bisulfito de sodio y secuenciación del promotor p53</b>	
BIP53 F	5' TTATAGTTTTGGTTTGTAGAAT 3'
BIP53 R	5' TAACTCAAAAAAACTCATCAA 3'
<b>Oligonucleótidos anidados</b>	
BIAN P53 F	5' TTTTATTTTAAATGTTAGTA 3'
BIAN P53	R 5' CAATTCAATCAAAAACTTA 3'
<b>Bisulfito de sodio y secuenciación del sitio unión a CTCF</b>	
CTCFP53bshort	F 5' TTTTTTTGGGAGTAGGTAGAA 3'
CTCFP53bshort R	5' AACTACAACCTCCCAACAACC 3'
<b>MS-PCR del sitio de unión a CTCF</b>	
<b>Para los metilados</b>	
MSP CTCF P53ME F	5' GTTGCCTTTTTGTAGGC 3'
MSP CTCF P53ME R	5' AAACGCTTCTATCTTAACGAAA 3'
<b>Para los no-metilados</b>	
MSP CTCF P53UN F	5' TTTGTTGTTTTTTTGTAGGT 3'
MSP CTCF P53UN R	5' AAACACTTCTATCTTAACAAAAAAC 3'
<b>Oligonucleótidos para el diseño de sondas del ensayo de accesibilidades a enzimas de restricción</b>	
<b>Sonda 1</b>	
P53ECOF	5' TCAGAAATTCGGGGCAGAAAAC 3'
P53ECOR	5' AATGAATTCGAGTTCCGCCTC 3'
<b>Sonda 2</b>	
P53SDSTUR	5' CCGGAAATCCACTTCTCCAGGCCTCTGC 3'
P53SDF	5' CCGGAAATCCTCCACATTTACATTTCTGCT 3'
<b>Sonda utilizada para ensayos de retardo</b>	
Sitio de unión a CTCF en la región 5' del promotor de p53	5' CCTACGCTCCCCCTACCGAGTCCCGCGTAATTCTTAA- AGCACCTGCACCGCCCCCGCCGCTGCAGAGGGCG 3'
<b>Oligonucleótidos para las competiciones frías.</b>	
FPII	5' CCCAGGGATGTAATTACGTCCCT CCCCCGCTAGGGGGCAGCAGGCGCCCT 3'
Sp1	5' ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC 3'





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTINUACIÓN....	
<b>Nombre y Función</b>	<b>OLIGONUCLEÓTIDOS</b>
<b>Oligonucleótidos para el análisis de metilación del ADN global de la región p53-Wrap53</b>	
<b>Región 1</b>	
BS-CTCF-725-F	5' GTTTTTGGGATATAGTTGAGTT 3'
BS-CTCF-725-R	ATACTAAAAACACAATACTTTCA 3'
<b>Región 2</b>	
Bs-CTCF-bishortF	5' TTTTTTTGGGAGTAGGTAGAA 3'
Bs-CTCF-bishortF	5' AACTACAACCTCCAACAACC 3'
<b>Región 3</b>	
Bs-CTCF-CoreR	5' CTAAATACCTATATCAATACTAAA 3'
Bs-CTCF-CoreF	5' GTTTTTATTAAGTTTTAGGGTTTT 3'
<b>Región 4</b>	
BsP53promF	5' TTATAGTTTTGGTTGTAGAAT 3'
BsP53promR	5' TTATAGTTTTGGTTGTAGAAT 3'
nested	
BsnesP53promF	5' TTTTATTTTAAAATGTTAGTA 3'
BsnesP53promF	5' ATCAAATTCATCAAAAACCTTA 3'
<b>Región 5</b>	
BsdownP53P1F	5' GAGTAGGTAGTTGTTGGGTTT 3'
BsdownP53P1R	5' TATACATCTTTTATTTCAAAAATCC 3'
<b>Región 6</b>	
BsdownP53P2F	5' GGGAGTTTAAGTTGTTAAGGTTT 3'
BsdownP53P2R	5' CAAATACCCCTACCTTACAAAA 3'
<b>Región 7</b>	
Bs-islaCpGDownF	5' TTTTGGGTTAGGTTATTTTAGTT 3'
Bs-islaCpGDownR	5' AACCAAACTCATCTCCTATAC 3'
<b>Controles de metilación</b>	
<b>Análisis de la metilación del ADN endógena</b>	
<b>Alu (Accession U14574)</b>	
Bs- Alu-sense	5' TTTTATTAAAAATATAAAAATTAGT 3'
Bs-Alu-anti-sense	5' CCCAACTAAAATACAATAA 3'
<b>FZD9 gene</b>	
BS-FZD9 FWR	5' GTTTTTAAAGTTTAGTGGGAGG 3'
BS-FZD9-REV	5' ATAACCCAACAATTAACATAC 3'
<b>Análisis de la metilación del ADN <i>in vitro</i></b>	
<b>P53 IVD</b>	
Se utilizaron los mismos oligonucleótidos que	
para el análisis de metilación endógena del promotor	
del gen p53 humano (Region 4).	
Se utilizó ADN de linfocitos de sangre periférica	
metilado <i>in vitro</i> con la metilasa SssI por 8 horas.	

**Tabla 5.** Lista de oligonucleótidos sintéticos utilizados para el desarrollo de éste proyecto, todos ellos fueron resuspendidos a 100 pmoles en agua estéril.

### Clonación del promotor del gen p53 humano.

La secuencia promotora del gen p53 humano (número de acceso en GeneBank: X61505) fue amplificada mediante PCR a partir de ADN genómico extraído de linfocitos de sangre periférica de un donador sano (Protocolo de extracción de ADN) utilizando los oligonucleótidos p53 promF- p53promR (ver Tabla 5).

# MAPAS DE PLÁSMIDOS UTILIZADOS DURANTE EL DESARROLLO DEL PROYECTO.

<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">AUTOR Ernesto Soto Reyes Solís</td> <td style="width: 50%;">NOMBRE DEL PLASMIDO p53-GFP</td> </tr> <tr> <td>FECHA 3 Agosto 06</td> <td>INTENSION Hacer Transfecciones estables</td> </tr> <tr> <td colspan="2">PROCEDIMIENTO DE CLONACION El promotor de p53 se obtuvo del vector pGL3p53 con XhoI-Hind III</td> </tr> <tr> <td>MINIPRE <input type="checkbox"/></td> <td>MIDIPRE <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>MAXIPRE <input type="checkbox"/></td> <td>GLICER <input type="checkbox"/></td> </tr> </table> <div style="text-align: center;"> <p><b>p53-GFP</b> 4708bp</p> </div>	AUTOR Ernesto Soto Reyes Solís	NOMBRE DEL PLASMIDO p53-GFP	FECHA 3 Agosto 06	INTENSION Hacer Transfecciones estables	PROCEDIMIENTO DE CLONACION El promotor de p53 se obtuvo del vector pGL3p53 con XhoI-Hind III		MINIPRE <input type="checkbox"/>	MIDIPRE <input type="checkbox"/>	MAXIPRE <input type="checkbox"/>	GLICER <input type="checkbox"/>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">AUTOR Ernesto Soto Reyes Solís</td> <td style="width: 50%;">NOMBRE DEL PLASMIDO pGL3p53</td> </tr> <tr> <td>FECHA 3 Agosto 06</td> <td>INTENSION Transfecciones transitorias</td> </tr> <tr> <td colspan="2">PROCEDIMIENTO DE CLONACION Se obtuvo de PCR (esta clonación tiene una mutación puntal que no afecta su función) y se clonó con sitios BamHI en pGL3basic en su sitio Bgl II.</td> </tr> <tr> <td>MINIPRE <input type="checkbox"/></td> <td>MIDIPRE <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>MAXIPRE <input type="checkbox"/></td> <td>GLICER <input type="checkbox"/></td> </tr> </table> <div style="text-align: center;"> <p><b>pGL3p53</b> 5326bp</p> </div>	AUTOR Ernesto Soto Reyes Solís	NOMBRE DEL PLASMIDO pGL3p53	FECHA 3 Agosto 06	INTENSION Transfecciones transitorias	PROCEDIMIENTO DE CLONACION Se obtuvo de PCR (esta clonación tiene una mutación puntal que no afecta su función) y se clonó con sitios BamHI en pGL3basic en su sitio Bgl II.		MINIPRE <input type="checkbox"/>	MIDIPRE <input type="checkbox"/>	MAXIPRE <input type="checkbox"/>	GLICER <input type="checkbox"/>
AUTOR Ernesto Soto Reyes Solís	NOMBRE DEL PLASMIDO p53-GFP																				
FECHA 3 Agosto 06	INTENSION Hacer Transfecciones estables																				
PROCEDIMIENTO DE CLONACION El promotor de p53 se obtuvo del vector pGL3p53 con XhoI-Hind III																					
MINIPRE <input type="checkbox"/>	MIDIPRE <input type="checkbox"/>																				
MAXIPRE <input type="checkbox"/>	GLICER <input type="checkbox"/>																				
AUTOR Ernesto Soto Reyes Solís	NOMBRE DEL PLASMIDO pGL3p53																				
FECHA 3 Agosto 06	INTENSION Transfecciones transitorias																				
PROCEDIMIENTO DE CLONACION Se obtuvo de PCR (esta clonación tiene una mutación puntal que no afecta su función) y se clonó con sitios BamHI en pGL3basic en su sitio Bgl II.																					
MINIPRE <input type="checkbox"/>	MIDIPRE <input type="checkbox"/>																				
MAXIPRE <input type="checkbox"/>	GLICER <input type="checkbox"/>																				
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">AUTOR Ko Ishihara<sup>1</sup>, Mitsuo Oshimura<sup>2</sup> and Mitsuyoshi Nakao</td> <td style="width: 50%;">NOMBRE DEL PLASMIDO PCT1</td> </tr> <tr> <td>FECHA 15 Agosto 07</td> <td>INTENSION shRNA de CTCF humano</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Referencia: Mol. Cel. <a href="#">Volume 23, Issue 5</a>, 1 September 2006, Pages 733-742 clonado en BamHI- HindIII</td> </tr> <tr> <td>MINIPRE <input type="checkbox"/></td> <td>MIDIPRE <input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>MAXIPRE <input type="checkbox"/></td> <td>GLICERO <input type="checkbox"/></td> </tr> </table> <div style="text-align: center;"> <p><b>PCT1</b> 4121bp</p> </div> <p style="font-size: small;">Secuencia de shRNA: 5'-GATCCGTGTCTAAAGAGGGCCTTGTCAAGAGAC AAGGCCCTCTTTAGACACTTTTTGGAAA-3' y 5'-AGCTTTTCCAAAAAGTGTCTAAAGAGGGCCTTGTCTCTTGAAC AAGGCCCTCTTTAGACACG-3'</p>		AUTOR Ko Ishihara <sup>1</sup> , Mitsuo Oshimura <sup>2</sup> and Mitsuyoshi Nakao	NOMBRE DEL PLASMIDO PCT1	FECHA 15 Agosto 07	INTENSION shRNA de CTCF humano	Referencia: Mol. Cel. <a href="#">Volume 23, Issue 5</a> , 1 September 2006, Pages 733-742 clonado en BamHI- HindIII		MINIPRE <input type="checkbox"/>	MIDIPRE <input type="checkbox"/>	MAXIPRE <input type="checkbox"/>	GLICERO <input type="checkbox"/>										
AUTOR Ko Ishihara <sup>1</sup> , Mitsuo Oshimura <sup>2</sup> and Mitsuyoshi Nakao	NOMBRE DEL PLASMIDO PCT1																				
FECHA 15 Agosto 07	INTENSION shRNA de CTCF humano																				
Referencia: Mol. Cel. <a href="#">Volume 23, Issue 5</a> , 1 September 2006, Pages 733-742 clonado en BamHI- HindIII																					
MINIPRE <input type="checkbox"/>	MIDIPRE <input type="checkbox"/>																				
MAXIPRE <input type="checkbox"/>	GLICERO <input type="checkbox"/>																				

## Construcción de los plásmidos.

Para la construcción del plásmido pGL3p53, que contiene el promotor mínimo frente al gen reportero de Luciferasa (*Luc*), el fragmento del promotor se ligó en el vector pGL3-basic (Promega). Posteriormente se secuenció el promotor para evaluar su integridad y sub-clonó en el plásmido pEGFP1 (Clontech) que contiene al gen reportero de la proteína verde fluorescente o *GFP* (del inglés: green fluorescent protein). Dicho plásmido se construyó con la finalidad de evaluar la actividad del promotor sobre un gen reportero en células transfectadas de manera estable y poder medir la actividad del gen reportero por citometría de flujo.

## Sistema celular.

Las distintas líneas celulares transformadas humanas utilizadas en el presente estudio fueron cultivadas con las condiciones que a continuación se describen.

Línea celular	Origen	Medio de cultivo	Observaciones
SW480	Adenocarcinoma colorectal	DMEM-F12 con 10% SFB y 1% de amp/strepto	Expresión a p53 +++, p53 nuclear. CTCF positiva
HeLa	Adenocarcinoma de cervix	DMEM con 10% SFB y 1% de amp/strepto	Expresión a p53 ++, p53 citoplasmática. CTCF positiva
Kb	Carcinoma epidermal de boca	RPMI 1640 con 10% SFB y 1% de amp/strepto	Expresión a p53 +, p53 citoplasmática. CTCF positiva
T98G (T98-G)	Glioblastoma multiforme	RPMI 1640 con 10% SFB y 1% de amp/strepto	Expresión a p53 nula
U-87 MG	Glioblastoma; Astrocitoma. Grado III	RPMI 1640 con 10% SFB y 1% de amp/strepto	Expresión a p53 nula
LN-18	Glioblastoma obtenido del lóbulo temporal derecho. Grado IV	RPMI 1640 con 10% SFB y 1% de amp/strepto	Expresión a p53 no caracterizada

HeLa-kd-CTCF	Adenocarcinoma de cérvix. Transfectada con un shRNA vs CTCF (pCT1).	DMEM con 10% SFB y 1% de amp/strepto	Expresión a p53 nula, no hay presencia de proteína. CTCF nulo en núcleo
Fibroblastos humanos	Aislado de prepucio fetal humano	DMEM con 15% SFB y 1% de amp/strepto	Expresión a p53 +
Linfocitos humanos	Aislados de sangre periférica de un donador sano	RPMI 1640 con 10% SFB y 1% de amp/strepto	Expresión a p53 +
K562	Eritroleucemia	IMEM con 10% SFB y 1% de amp/strepto	

**Tabla 6.** Líneas celulares tumorales humanas y cultivos primarios utilizados para el desarrollo del proyecto. Todas las células fueron mantenidas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, las condiciones de cultivo se encuentran descritas para cada una de ellas. Los signos de + en observaciones denota el grado de p53.

Los linfocitos de sangre periférica de humano fueron obtenidos por venopunción de un donador sano empleando el método de centrifugación diferencial con Ficoll-paque plus (Amersham). El cultivo primario de fibroblastos humanos fue amablemente donado por el Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo (Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Instituto Nacional de Cancerología, Mexico, D.F., Mexico).

### **Evaluación del estado de metilación del ADN.**

Para el análisis de la metilación del ADN se utilizó el método de conversión del ADN por bisulfito de sodio y posterior clonación en un vector para su secuenciación (Clark et al., 2006; para mayor detalle ver protocolos ampliados). Para la obtención del fragmento de ADN, se realizaron dos reacciones de PCR a partir de dos juegos de oligonucleótidos sintéticos. Para la reacción de PCR externa se utilizaron los oligonucleótidos bisp53 F y bisp53R, y para la reacción de PCR anidada bisanp53 F y bisanp53 R (para mayor detalle de la secuencia de los oligonucleótidos, ver Tabla 5). Para los análisis de secuenciación, los productos de PCR fueron clonados en el vector comercial pGEM-T-easy® (Promega) y secuenciados con el protocolo “Big-dye”

utilizando el oligonucleótido T7 como cebador. Se empleó el secuenciador ABI Prism 3130 de la compañía Applied Biosystems.

.

## PROTOSCOLOS AMPLIADOS.

### PROTOSCOLO de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

#### (JENUWEIN LAB)

- 1) **CÉLULAS:** Para realizar este protocolo se necesitan cultivar las células en 6 cajas de 150 mm a una confluencia del 80%.
- 2) **ENTRECRUZAMIENTO Ó “CROSSLINKING”:** Una vez obtenido la cantidad de células necesarias se añaden 2 ml de buffer “crosslinking Mix” directamente al medio de las células (nota: el volumen debe de ser de 20 ml) para obtener una concentración final de formaldehído al 1%. Se mantienen moviendo las células por 10 minutos.
- 3) **DETENER EL “CROSSLINKING”:** Una vez transcurrido el tiempo se detiene la reacción de “crosslinking” añadiendo 1 ml de glicina 2.5 M para obtener una concentración final de 125 mM. Las células se mantienen en agitación constante durante 5 minutos.
- 4) **LAVADO DE LAS CÉLULAS CON PBS:** Se retira el medio y se lavan las células 3 veces con PBS frío (4°C).
- 5) **LISIS:** Posteriormente se remueve el PBS y se adicionan 1 ml de Buffer de Lisis a cada una de las cajas, y se incuba a 4°C de 3-5 minutos. Transcurrido el tiempo se cosechan las células con un gendarme y las células se transfieren a un tubo de 50 ml.
- 6) **SONICACIÓN:** Para sonicar las células se coloca el tubo de 50 ml en un vaso con hielo, para que se mantenga frío y evitando de no generar mucha espuma (como ejemplo de sonicación para HeLa se sonica con el programa 3 que corresponde a una sonicación por 30 segundos (pulsos 2.0 0.5 amplitud 35%). Las células sonicadas pueden



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



almacenarse a 4°C por 3 o 4 meses (en presencia de un coctel adecuado de inhibidores de proteasas).

- 7) **EVALUACIÓN DE LA SONICACIÓN:** Para determinar si la sonicación fue adecuada, es decir, si el grado de fragmentación de la cromatina corresponde al tamaño esperado (300 a 600 pb), se toman 50 µl de muestra y se le adicionan 5 µl de RNasa y Proteinasa K, incuba por 30 minutos y posteriormente a 65°C por al menos 5 horas o toda la noche. Después se hacen 2 extracciones de fenol/cloroformo (llevar la muestra a un volumen final de 400 µl con agua) y se precipita el ADN (añadir 1 ml de ETOH al 100% y 165 µl de acetato de amonio 10 M (0.33 Vol)). Posteriormente se corre un gel al 1% para evaluar el tamaño de la cromatina.
- 8) **AJUSTE DE CROMATINA:** Una vez que ya se tiene calibrado el tamaño de la cromatina se puede medir la concentración de la misma, y se puede ajustar a 1 µg/µl adicionando buffer de lisis (Esto se puede guardar a 4°C por 4 meses como máximo).
- 9) **INMUNOPRECIPITACIÓN (IP):** Para llevar a cabo la inmunoprecipitación se centrifugan 420 µl) de la cromatina sonicada por 5 minutos a máxima velocidad (se puede hacer una la centrífuga no refrigerada). Con cuidado se toma 400 µl de la cromatina y se lleva a un volumen final de 4 ml con: 9 partes de "Dilution Buffer" y 1 parte de Buffer de lisis en presencia de un coctel de inhibidores de proteasas (todo esto en un tubo falcon de 15 ml).

- 10) **ANTICUERPOS:** Se añade a cada IP 4  $\mu\text{g}$  de anticuerpo que se mantienen en incubación a 4°C por 6 horas o durante toda la noche, en rotación.
- 11) **PREPARACIÓN DE PERLAS PARA LA IP:** Se toman 0.2 g de proteína A (Amersham Protein A Sepharose CL-4B) y 100  $\mu\text{l}$  de perlas proteína G (Ge Healthcare protein G sepharose) en un volumen final de 2 ml de Buffer de dilución 9:1: lisis Buffer (1.8 ml de buffer de dilución 9:1 y 200  $\mu\text{l}$  de Lisis Buffer). A esta mezcla se le adicionan 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de BSA (20  $\mu\text{l}$  de BSA al 10%) y 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de esperma de salmón (Invitrogen cat. No. 15632-011; fragmentado de 100-200 pb) como competidores inespecíficos (50  $\mu\text{l}$  de esperma a 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y se dejan rotando a la par con los AB de las IPs. El día siguiente se retira el buffer de las perlas y se lavan dos veces con buffer de dilución y se resuspenden en un buffer de 9:1 de buffer de dilución y buffer de lisis (2 ml volumen final).
- 12) **ADICIÓN DE PERLAS A LAS IPs:** Se añaden 50  $\mu\text{l}$  de perlas a cada uno de los tubos falcon y se incuban por 2 hrs mientras están rotando a 4°C.
- 13) **LAVADO DE PERLAS:** Se centrifugan los falcon a 2000 rpm (microcentrífuga 5415-D Eppendorf) por 2 minutos y con mucho cuidado se remueve el sobrenadante. Se llevan las perlas con 1 ml de "Buffer Wash" y se transfieren a un nuevo tubo eppendorf. Esto se repite 3 veces más (siendo un total de lavados 4 con el "Buffer Wash") y finalmente se lava 1 vez con 1 ml de "Final Wash" (**Nota:** No se aspire el líquido, dado que se pueden perder las perlas y las centrifugaciones entre lavados es de 2 minutos a 2000 rpm).

- 14) **ELUCION DEL ADN:** Para eluir las IPs se adicionan 450 µl de “Elution Buffer” y se adicionan Proteinasa K y RNasa A (500 µg/ml cada una) y se incuba a 37°C por 30 minutos.
- 15) **COLECTAR LA FRACCIÓN LLAMADA “INPUT”:** Esta fracción es la que contiene una muestra de todas las secuencias presentes en el genoma, con lo cual podremos determinar si las reacciones de PCR y sus productos son los esperados. Para ello de la cromatina se toman 400 µl de esta y se tratan de la misma forma que las IPs
- 16) **REVERTIR EL ENTRECruzAMIENTO:** Se dejan las muestras a 65°C por almenos 6 horas o toda la noche.
- 17) **PURIFICACIÓN FINAL DEL ADN:** Realizar la extracción Fenol-Cloroformo de las IP precipitando con 20 µg de glicógeno como “acarreador”, o también se pueden utilizar las columnas de “Qiagen mini-elute” para obtener el ADN.
- 18) **RESUSPENDER DEL ADN:** Se resuspende el ADN con 50 µl de agua estéril. Incubando a 37°C por 30 minutos y posteriormente se procede a realizar la reacción de PCR.

**Nota:** El “INPUT” se puede diluir 1/100 a 1/400 y de ésta dilución utilizar 2 µl por PCR.

**Buffers utilizados para el ensayo de ChIP.**

<b>CROSSLINKING MIX</b> 11 % Formaldehido 100 mM NaCl 0.5 mM de EGTA 50 mM de HEPES, pH 8.0.	<b>LYSIS BUFFER</b> 1 % de SDS 10 mM de EDTA, pH 8.0 50 mM de Tris-HCl pH 8.0 Todo con inhibidores de proteasas.
<b>DILUTION BUFFER</b> 1% de Triton X-100 150 mM de NaCl 2 mM de EDTA pH 8.0 20 mM de Tris-HCl pH 8.0 Todo con inhibidores de proteasas.	<b>WASH BUFFER</b> 1 % de Triton X-100 0.1 % de SDS 150 mM de NaCl 2 mM EDTA, pH 8.0 20 mM de Tris-HCl pH 8.0 Todo con inhibidores de proteasas.
<b>FINAL WASH</b> 1% de Tritón X-100 0.1 % de SDS	<b>ELUTION BUFFER</b> 1 % de SDS

500 mM de NaCl 2 mM de EDTA pH 8.0 20 mM de Tris-HCl pH 8.0 Todo con inhibidores de proteasas complete, EDTA-free ROCHE (11-873-580-001).	100 mM NaHCO <sub>3</sub> .
--	-----------------------------

## PROTOCOLO INMUNOFLUORESCENCIA

1. Sembrar  $1 \times 10^5$  células en cada pozo que contenga un cubreobjetos limpio (placa con 6 pozos) y dejar en cultivo 24 horas (también se pueden crecer las células en una caja de 10 cm que contengan cubreobjetos).
  2. Agregar 1 ml de formaldehído (1 o 4%) a cada pozo e incubar por 10 minutos.
  3. Eliminar formaldehído y hacer 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1x.
  4. Agregar 1 ml de Tritón x-100 (0.1%) e incuba por 5 minutos.
  5. Eliminar Tritón y hacer 3 lavados con PBS 1x de 3 minutos cada uno.
  6. Agregar 1 ml de glicina 100 mM e incubar 1 hora.
  7. Remover la glicina, y agregar 100  $\mu$ l anticuerpo primario (la dilución varía dependiendo el anticuerpo). Incubar por una hora a temperatura ambiente y en una cámara húmeda ("Tupperware" con sanitas húmedas sobre 2 soportes). Nota: también se puede dejar el anticuerpo primario toda la noche a 4°C.
  8. Hacer 3 lavados con PBS 1x de 5 minutos cada uno.
  9. Agregar 200  $\mu$ l del anticuerpo secundario (1:200) durante 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda, y protegido de la luz con papel aluminio.
- Nota:** El anticuerpo secundario se encuentra a 2  $\mu$ g/ $\mu$ l y de ahí se utiliza a una dilución de 1:200 en PBS 1x pH 7.4.
10. Hacer 3 lavados con PBS 1x de 3 minutos cada uno.

## 11. Montaje:

- a) Utilizar un porta objetos limpio.
- b) Agregar una gota de medio de montaje (Vecta shield con DAPI) para cada cubreobjetos.
- c) Colocar el cubre objetos cuidando de no dejar burbujas.
- d) Posteriormente presionar levemente con un papel para quitar el exceso de medio de montaje y otro con más presión.
- e) Sellar las orillas con barniz de uñas para evitar que se seque la muestra.
- f) Estas pueden ser conservadas a 4°C por unas semanas o a -20°C por meses, todas cubiertas con papel aluminio para evitar la luz.

## NOTAS IMPORTANTES:

Tener cuidado en mantener las muestras siempre húmedas y hacer las incubaciones en cámara húmeda para evitar el secado de las muestras.

## BUFFERS:

### Formaldehído 4% (50 ml)

5.4 ml de formaldehído

2.5 ml Tritón x-100

Aforar a 50 ml PBS 1x

### PBS 1x (1 litro)

8 g de NaCl

0.2 g de KCl

1.44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0.24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

llevarlo a pH 7.4

### Glicina 100 mM (50 ml)

0.375 g glicina

Aforar a 50 ml PBS 1x

### Tritón X-100 5% (50 ml)

Aforar a 50 ml PBS 1x

### **PROTOCOLO DE IMPREGNACIÓN ARGÉNTICA PARA LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS ARGENTOAFINES DE LA REGIÓN ORGANIZADORA NUCLEOLAR (AgNOR)**

Esta técnica permite evaluar a los componentes proteicos asociados a los organizadores nucleolares (NOR). El número y tamaño de los NOR pueden reflejar directamente la actividad celular, proliferación y transformación en cáncer. A su vez permite determinar específicamente a los componentes proteicos propios del nucléolo.

12. Sembrar  $1 \times 10^5$  células en cada pozo que contenga un cubreobjetos limpio (placa con 6 pozos) y dejar en cultivo 24 horas (también se pueden crecer las células en una caja de 10 cm que contengan cubreobjetos).
13. Agregar 1 ml de formaldehído (1 o 4%) a cada pozo e incubar por 10 minutos.
14. Eliminar formaldehído y hacer 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1x.
15. Realizar un último lavado con agua destilada.
16. Preparar solución de Nitrato de plata 50% en agua destilada
17. Mezclar 1 parte de solución de gelatina de ácido fórmico y 2 partes de nitrato de plata (250  $\mu$ l de Gelatina: 500  $\mu$ l de Nitrato de plata = solución de plata).
18. Incubar la preparación con solución de plata durante 40 minutos a TA

19. Lavar con agua destilada

20. Posteriormente se utiliza un tren de deshidratación de la siguiente forma:

1. OH 30% por 5 minutos
2. OH 50% por 5 minutos
3. OH 70% por 5 minutos
4. OH 90% por 5 minutos
5. OH 96% por 5 minutos
6. OH 100% por 5 minutos
7. OH 100% : Xilol por 5 minutos
8. Xilol por 5 minutos
9. Los cubreobjetos son montados en un portaobjetos utilizando el medio de montaje Entelan.

## **GENERACIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR ESTABLE DEFICIENTE A CTCF POR MEDIO DE UNA TRANSFECCIÓN EN CÉLULAS HeLa**

### **MATERIAL**

- Cultivar las células HeLa en un medio Dulbecco MEM (D-MEM con 10% de suero Fetal Bovino (FBS) y Penicilina-Streptomicina al 1 %. Mantener las células a 37°C en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>.

- Previamente se linearizó el plásmido pCT1, amablemente donado por el Dr. Ishihara de la Universidad de Kumamoto, Honjo (Ishihara et al., 2006) con EcoRI para realizar una transfección estable.

### **METODOLOGÍA**

#### **1<sup>er</sup> DIA**

Un día antes de realizar la transfección tripsinizar y contar las células, para sembrar  $3 \times 10^5$  células en platos de 6 pozos ( $3 \times 10^5$  por cada pozo) con 3 ml de medio complementado

#### **2° DIA**



Remover el medio de cultivo de las células, realizar 2 lavados con PBS pH 7.4 y añadir medio fresco que no tenga suero (DMEM solo). Para realizar la transfección, se decidió utilizar 3 concentraciones de plásmido 0.2, 0.5 y 1 µg del plásmido pCT1 linearizado. Por cada pozo con células, se tiene que diluir la concentración de ADN en 100 µl de medio DMEM libre de suero, y añadir 20 µl del reactivo Lipofectamina-PLUS (Invitrogen). Incubar 15 minutos a temperatura ambiente. Por cada pozo diluir de 4 µl de LIPOFECTAMINA (Invitrogen) en 100 µl de medio D-MEM libre de suero, e incubar 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez que la LIPOFECTAMINA ha sido diluida, mezclarla lentamente con el ADN (del paso 3) por un periodo de al menos 15 minutos a temperatura ambiente (Esta dilución puede prepararse utilizando una mezcla para todos los pozos).

En este punto, mientras pasa el tiempo necesario para completar la formación del complejo (paso 5), se puede retirar el medio de cultivo de las células de los pozos, lavar con PBS y añadir 800 µl de medio DMEM libre de suero. Añadir por goteo la mezcla formada por el complejo de ADN-Liposomas a cada uno de los pozos que contienen previamente medio fresco libre de suero, e incubarlo a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub> por 6 hrs. Transcurrido el tiempo, retirar el medio de cultivo con la reacción y agregar 3 ml de medio completo (que contenga SFB al 10%). Las células se cosechan a partir de las 72 hrs post-transfección y se subcultivan a una placa de 10 cm<sup>2</sup>.

Como parte de la selección de las clonas estables, se realiza una incubación con Puromicina (Sigma-Aldrich P8833) a una concentración final de 1

$\mu\text{g/ml}$  en medio completo durante 4 a 7 días. Para determinar el efecto del plásmido, realizar un Western Blot en contra de CTCF y/o inmunofluorescencia.

**Nota:** Mantener al cultivo celular con el medio de selección con puromicina.

## PROTOCOLO DE BISULFITO DE SODIO

1. Digerir 1  $\mu\text{g}$  de ADN con una enzima de restricción adecuada (es decir que no corte en la secuencia deseada) en un volumen de 18  $\mu\text{l}$  por 6 hrs.
2. Calentar por 2 min a  $95^{\circ}\text{C}$  e incubar inmediatamente en hielo por 2-5 minutos.
3. Desnaturalizar el ADN en un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  añadiendo al ADN 2  $\mu\text{l}$  de NaOH 3 M (0.12 g en 1 ml de agua a una concentración final 0.3 M) e incubar 5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ .
4. Durante los pasos 2 y 3 o algunos minutos antes preparar una solución fresca de Hidroquinona (Sigma, H-9003) 100 mM (0.022 g en 2 ml de agua bidestilada) y de bisulfito de sodio (Sigma, S-8890) 2 M (3.8 g en 10 ml de agua bidestilada) ajustar el bisulfito a pH 5.0 con NaOH 10 M (0.8 g en 2 ml de agua). El bisulfito tarda unos minutos en disolverse, se recomienda prepararlo en un tubo de 15 ml y mezclar muy suavemente, tratar de evitar su exposición a la luz y mantenerlo cerrado la mayor parte del tiempo.
5. Agregar 12  $\mu\text{l}$  de hidroquinona 10 mM (diluir el "stock" preparado 1:10) al ADN desnaturalizado, Mezclar con la pipeta (la solución se pone ligeramente amarilla) posteriormente añadir 208  $\mu\text{l}$  de la solución de bisulfito de sodio mezclar suavemente con el vortex y añadir 100  $\mu\text{l}$  de aceite mineral.
6. Incubar a  $55^{\circ}\text{C}$  por 16 horas en oscuridad.
7. Retirar el aceite mineral (congelar a  $-70^{\circ}\text{C}$  y retirar el aceite no congelado).
8. Remover el bisulfito pasando la muestra por las columnas Wizard (Promega, A- 7280) y eluir en 50  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada.
9. Añadir 5.5  $\mu\text{l}$  de NaOH 3 M e incubar 15 min a  $37^{\circ}\text{C}$ .

10. Añadir 20  $\mu\text{g}$  de glicógeno como acarreador para precipitar y 33.3  $\mu\text{l}$  de acetato de amonio 5 M pH 7.0 mezclar por vortex y añadir 300  $\mu\text{l}$  de etanol 100 %. Precipitar por 4 horas a  $-70^{\circ}\text{C}$  o toda la noche.
11. Centrifugar a 13,000 rpm por 1 hr a  $4^{\circ}\text{C}$ , en una microcentrífuga retirar el etanol, lavar el pellet con 300  $\mu\text{l}$  de etanol 70%, dejar secar el pellet (no demasiado ya que es difícil de resuspender) y resuspender la muestra en 30  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada.
12. Guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
13. Con ello el material está listo para ser amplificado por PCR con oligonucleótidos modificados.

**Notas:**

- Todas las soluciones deben prepararse en el momento (excepto el acetato de amonio).
- Usar 10  $\mu\text{l}$  del volumen final para la PCR.
- Diseñar los oligonucleótidos para que reconozcan la secuencia modificada por bisulfito de sodio.
- Se aconseja realizar una reacción de PCR anidada de 35 ciclos C/U.
- Usualmente en la primer PCR no se ve la banda esperada, pero tomar 10  $\mu\text{l}$  de la reacción y hacer la segunda PCR con los oligonucleótidos internos.

## PROTOCOLO DE RT-PCR

### MATERIAL:

1 µg de RNA.  
Kit de RT-PCR Promega (A3500)

### METODOLOGÍA

1.- Se realiza la siguiente reacción:

4 µl de MgCl<sub>2</sub>  
2 µl de Buffer RT (10X)  
2 µl de dNTPs (10 mM)  
0.5 µl de Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor.  
1 µl de AMV Reverse Transcriptase  
1 µl de Oligo dT  
5 µg de RNA  
Aforar la reacción con H<sub>2</sub>O libre de nucleasas Aforar la reacción a un **volumen final de 20 µl.**

2.- Mezclar la reacción por Vortex e incubarla por 10 minutos a temperatura ambiente.

3.- Transcurrido el tiempo incubar los tubos a 42°C por 60 minutos.

4.- Transcurrido el tiempo incubar los tubos a 95°C por 5 minutos

5.- Transcurrido el tiempo incubar los tubos en Hielo por 5 minutos.

6.- Agregar 40 µl de agua libre de RNasa (del Kit)

NOTA: a) Esta reacción se puede realizar en termociclador o en un baño de temperatura regulable.

b) De aquí ya se pueden congelar o usar directamente para la PCR.

### METODOLOGÍA PARA REALIZAR LA PCR DE LA RT.

7.- Para realizar la PCR se realiza la siguiente reacción:

- Tomar 10 µl de la reacción.
- 1 µl de dNTPs
- 4 µl de MgCl<sub>2</sub>
- 5 µl de Buffer Reverse Transcription (10X).
- 1.5 µl de Oligo fwr (15 pmoles)
- 1.5 µl de Oligo rev (15 pmoles)
- 1 µl de Taq
- 25 µl de agua.

En un volumen final de 50 µl.

## PROTOCOLO DE SOUTHERN BLOT

### Preparación de la muestra de ADN genómico

1. Partir de entre 10 a 50  $\mu\text{g}$  de ADN por muestra.

Delimitar la región de estudio con una digestión enzimática (usar entre 1 unidad y 1.5 unidades de enzima por cada  $\mu\text{g}$  de ADN. Digerir toda la noche (si la enzima lo permite).

2. Hacer 1 extracción fenol/cloroformo.
3. Precipitar con acetato de amonio 10 M (0.33 Volúmenes) + de 1 a 2 volúmenes de 2-Propanol toda la noche.
4. Centrifugar 45 min a 13,000 rpm en una microcentrífuga.
5. Lavar el pellet 2 veces con 500  $\mu\text{l}$  de EtOH 70%, centrifugando 30 minutos a 13,000 rpm.
6. Dejar secar bien el pellet y resuspender en 26  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ .

### Electroforesis en gel de agarosa

1. Separar las muestras en un gel de agarosa al 1% preparado con TBE 0.5 X
2. Incorporar un marcador de peso molecular marcado radioactivamente y otro no marcado.
3. Correr a 110 Volts por aproximadamente 7 horas.

(Dependiendo si la digestión es simultánea o secuencial se realizan las extracciones fenol-cloroformo necesario así como las precipitaciones toda la noche y los lavados para resuspender en un volumen no mayor a 15  $\mu\text{l}$ )

## Transferencia

### Material necesario

- 2 refractarios pirex (uno grande y otro chico).
- 2 vidrios gruesos.
- 1 catálogo de contrapeso (aprox. 0.5 Kg).
- Papel 3 MM Whatman (1 largo 4 cm más ancho que el gel y 3 chicos del tamaño del gel).
- Papel N<sup>+</sup> (Amersham, Hybond-XL) (nylon para transferencia **nota:** el lado positivo está del lado donde se curva).
- Buffer de transferencia NaOH 0.5 M (20 gramos en 1000 ml).
- Pipeta de 10 ml.
- Egapack.
- Servi-toallas, dobladas de forma que cubran al gel, una pila como de 10-15 cm.

1. Montar el vidrio sobre el refractario.
2. Colocar el papel 3 MM que cuelgue al interior y hasta el fondo del refractario.
3. Agregar el NaOH 0.5 M al interior del refractario, dejando que se moje el papel mientras se prepara el gel.
  - Cortar el exceso del gel.
  - Tomar foto con regla en el transiluminador.
  - Voltear y después de enjuagar con un poco de NaOH 0.5 M, colocar en el papel 3 MM que esta sobre el vidrio (Al papel 3MM, se le agrega un poco de NaOH 0.5 M de modo que se empape. Sacar las burbujas que queden con la pipeta).
4. Colocar sobre el gel el papel Hybon N<sup>+</sup> (con la cara interna sobre el gel).
5. Remover las burbujas que queden la membrana y el gel.





3. Pre-hibridar 1 hora a 65°C con agitación constante.
4. Desnaturalizar la sonda justo antes de agregarla (5 min a 95°C, 3 min en hielo).
5. Agregar la sonda desnaturalizada y previamente marcada con un buen porcentaje de incorporación (más del 20%).
6. Dejar girando en el horno de 12 a 24 horas.
7. Lavar de la siguiente manera:

### **Lavado de membrana**

#### **Buffer 1**

10 ml SSC 20 X  
1 ml SDS 10 %  
Llevar a 100 ml

#### **Buffer 2**

0.75 ml SSC 20X  
1 ml SDS 10 %  
Llevar a 100 ml

8. Enjuagar con 50 ml de buffer 1 precalentada a 65°C.
9. Lavar con 50 ml de buffer 1 precalentada a 65°C por 45 minutos.
10. Enjuagar con 50 ml de buffer 2 precalentada a 65°C
11. Lavar con 50 ml de buffer 2 precalentada a 65°C por 45 minutos
12. Envolver en Egapack (sin que queden arrugas).
13. Exponer toda la noche.
14. Subir al Thyphoon ó exponer un film y dejar en el a -70°C.

### **Revelado de film**

1. Sacar el cassette del -70°C y dejarlo por 10 minutos a Temperatura ambiente.
2. Poner en bandejas el fijador, agua y revelador.
3. Apagar luz (Asegurarse que el foco rojo está prendido y las puertas cerradas con seguro).
4. Sacar el film del cassette y ponerlo en la bandeja con revelador.
5. Esperar a que aparezca la señal (no más de un minuto)
6. Enjuagar en el H<sub>2</sub>O.
7. Poner en el fijador hasta que se ponga transparente el film.
8. Enjuagar el film con H<sub>2</sub>O corriente.
9. Dejar secar.
10. Enjuagar bandejas con H<sub>2</sub>O y guardar sustancias.

## PROTOCOLO DE WESTERN BLOT (WB)

### MATERIAL.

Cámara para electroforesis para WB

Cámara para transferencia para WB

Vidrio para gel.

Soporte para hacer gel.

### Preparación de gel:

- a) Montar los vidrios del WB para proceder a la preparación del gel (BioRad)

**“Gel resolving” (10%, la concentración puede variar dependiendo de la masa de la proteína que se desee resolver)**

- Resolving buffer 1.25 ml
- Acrilamida (40%) 2.5 ml
- SDS (10%) 100 µl
- H<sub>2</sub>O 6.04 ml
- PSA (10%) 100 µl
- Temed 10 µl

**Nota:** La mezcla debe de utilizarse en 1 menos de un minuto, debido a que se polimeriza muy rápido y agregar 500 µl de metanol para que el gel quede horizontalmente uniforme.

- f) Dejar que polimerice por 40 min.

g) Transcurrido el tiempo se quita el metanol por decantación y se lava dos veces con agua bidestilada.

- h) Se coloca otra vez en el soporte y se prepara el siguiente gel (**Gel Spacer**):

**“Gel spacer” (3 %)**

- Spacer buffer 1.25 ml
- Acrilamida (40%) 0.75 ml
- SDS (10%) 100 µl

- H<sub>2</sub>O 7.8 ml
- PSA (10%) 100 µl
- Temed 10 µl
- 
- i) Servir la acrilamida (gel spacer) y colocar el peine, este tarda en polimerizar 30 minutos aproximadamente.

### **Preparación de extractos protéicos**

Se disgregan los cultivos celulares por medio de tripsina, se inactiva adicionando medio completo, posteriormente se centrifugan a 1200 rpm por 5 minutos y se remueve el medio, hacer un lavado con PBS para evitar que contenga proteínas del medio que puedan afectar las lecturas de la cuantificación de la proteína.

### **Preparación de buffer RIPA modificado**

#### **RIPA Buffer: (Maniatis)**

- 50 mM Tris-Cl (ph 7.5)
- 150 mM NaCl
- 1% Nonidet P-40 (NP-40)
- 0.5% deoxicolato de sodio
- 0.1% SDS

**Nota:** Todo con inhibidores de proteasas complete, EDTA-free ROCHE (11-873-580-001).

- Tomar  $1 \times 10^6$  células y lisarlas con 100 µl de buffer RIPA frío
- Incubar en hielo 15 min. Centrifugar 5 min a máxima velocidad y transferir el sobrenadante a un tubo limpio
- Alicuotar 50 µl en tubos de 1.5 ml (Eppendorfs).

- **Nota:** Puede almacenarse en congelación (-70°C) hasta 3 días o más tiempo adicionando buffer Laemmli, y su descongelación debe realizarse en hielo.
- Medir la concentración de proteínas.
- Utilizar una cámara de pozos de ELISA.
- Diluir el Bradford 1:5 en agua desionizada.
- Bradford: “Bio-Rad protein assay Dye reagent concentrate” (BioRad).
- Colocar 200 µl del reactivo Bradford diluido en los pozos a utilizar como se muestra a continuación.

### CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS POR BRADFORD

Soluciones stock para la curva:

<b>BSA 100 ng/µl</b> 2 µl de BSA en 198 µl de agua	<b>BSA 500 ng/µl</b> 10 µl de BSA en 190 µl de agua
---	--

#### CURVA DE BSA:

Carril	(ng)	BSA(µl)	Agua(µl)
<b>A</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>20</b>
<b>B</b>	<b>200</b>	<b>2</b>	<b>18</b>
<b>C</b>	<b>300</b>	<b>3</b>	<b>17</b>
<b>D</b>	<b>500</b>	<b>5</b>	<b>15</b>
<b>E</b>	<b>1000</b>	<b>10</b>	<b>10</b>
<b>F</b>	<b>2000</b>	<b>20</b>	<b>0</b>
<b>G</b>	<b>5000</b>	<b>10<sup>(500)</sup></b>	<b>10</b>
<b>H</b>	<b>10000</b>	<b>20<sup>(500)</sup></b>	<b>0</b>

**Nota:** utilizar el BSA que viene con las enzimas de restricción New England Biolabs

- Añadir a cada pozo 200 µl de Bradford diluido 1:5.
- Todas las muestras se hacen por duplicado.
- Para las muestras usar 1 µl añadir 19 µl de agua y el bradford.
- Leer en el Elisa con el filtro 4 (570 nm).

- Adicionar buffer de cargado Laemmli, calentar a 100°C durante 10 min y las proteínas están listas para ser cargadas.

1. Preparar el gel de Acrilamida (ver protocolo).

Pasar a la cámara de electroforesis (BioRad) y llenar la cámara con buffer de electroforesis Tris-Glicina (Anexo como buffer de electrodo).

2. Cargar las muestras previamente calentadas y con buffer Laemmli (cargar de 20 a 40 µg de proteína).
3. Cargar el marcador de peso molecular (Protein ladder Invitrogen 10748-010).
4. Rellenar los pozos vacíos con buffer de cargado (5 µl).
5. Correr las proteínas por 10 minutos a una con una corriente de 20 mA
6. Correr las muestras por 30 minutos a 30 mA. Este tiempo se elige con base al tamaño de la proteína de interés.

Mojar la membrana PVDF (Millipore immobilion-P transfer membrane, Tamaño de poro: 0.45 µm) en metanol por un minuto y posteriormente dar 2 lavados con agua destilada. Este paso es para tornar la hidrofobicidad (volverla hidofílica).

Colocarla en el buffer de transferencia por lo menos 15 min antes de usarla.

**Buffer de transferencia:**

192 mM Glicina  
25 mM Tris-HCl  
20% Metanol (Nosotros utilizamos un buffer con metanol al 10%) pH = 8.3  
guardar frío.

De la misma forma colocar las esponjas y dos hojas de papel filtro (Mini Trans-Blot Filter Paper 1703932) en el buffer de transferencia

- Ensamblar del “sándwich”
- Retirar el gel con una espátula retirar uno de los dos vidrios y colocar un papel sobre el gel stacking para separarlo (Tener cuidado si el gel es menor al 10% de acrilamida, es muy frágil).
- Eliminar los bordes con la misma espátula y separar el gel del vidrio
- Dentro del un recipiente con buffer de transferencia colocar el aplastador con la parte negra hacia el fondo (parte negativa), abrir y colocar en el siguiente orden:

**Arriba**  
 Parte clara del cassette  
 Esponja  
 Papeles filtro  
 Membrana  
 Gel  
 Papeles filtro  
 Esponja  
 Parte negra del cassette  
**Abajo**

- Para armar el sándwich se hace lo siguiente todo en un recipiente de plástico con buffer de transferencia.
- Ensamblar el aparato de transferencia con la membrana hacia el electrodo positivo.
- Colocar la placa de hielo (provista en la cámara y almacenada a -20°C)
- Transferir a 500 mA con el aparato para minigeles de Bio-Rad, durante 2 horas, en cuarto frío, sobre una parilla magnética y con una mosca magnética.
- Preparar el buffer de bloqueo:

5% de leche en polvo descremada (Svelty, Nestle), 1% BSA (en polvo) aforar a 30 ml con TBS-Tween 0.1%. **TBS:** 0.05 M Tris, 0.15 M NaCl, pH = 7.5

- Colocar 5 ml de buffer de bloqueo en un recipiente (pequeño, pero suficiente para que quepa la membrana)
  - Separar el aparato de transferencia.
  - Desmontar el “sándwich” en el siguiente orden.
  - Quitar la esponja por la parte del electrodo positivo.
  - Quitar el papel filtro.
  - Levantar desde el papel filtro inferior, quedándose con filtro, gel y membrana.
  - Recortar la membrana al tamaño del gel.
  - Colocarla dentro del recipiente con la cara, que estaba en contacto con el gel, hacía arriba.
  - Saturar la membrana con el buffer de bloqueo de 1 a 2 horas a 4° C en agitación.
  - Adicionar el anticuerpo primario en solución de bloqueo (dependiendo de las especificaciones del anticuerpo para WB tanto para la concentración como para la solución).
  - Incubar toda la noche a 4°C.
  - Hacer 4 lavados con TBS-Tween (0.05%) de 5 minutos cada uno.
  - Adicionar el anticuerpo secundario en solución de bloqueo a una dilución 1:3000
2. Incubar 1 hora a 4°C en agitación.

3. Hacer 4 lavados con TBS-Tween (0.05 %) de 5 minutos cada uno.

#### **Revelado**

- Se preparar solución sustrato.
- 1.5 ml de cada reactivo (Super signal West-Pico Chemiluminescent Substrate, PIERCE Prod. 34080) e incubar por 5 minutos en oscuridad. Posteriormente se sacar y colocar entre una mica y se situa en el cassette de exposición con pantalla. Ya en el cuarto oscuro se pone un film sensible a la luz por 5 min.
- **Nota:** Si se requiere la utilización de otro anticuerpo para normalizar de distinta masa molecular, no es necesario desnudar ni bloquear, tan solo adicionar el otro anticuerpo según las especificaciones y repetir el ensayo.



## BIBLIOGRAFÍA.

- Allshire RC, y Karpen G.** 2008. Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat Rev Genet.* **9**, 923-937.
- Amatya VJ, Naumann U, Weller M, y Ohgaki H.** 2005. TP53 promoter methylation in human gliomas. *Acta Neuropathol.* **110**, 178-184.
- Antequera F.** 2003. Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci.* **60**, 1647-1658.
- Ashley, DJ.** 1969. The two "hit" and multiple "hit" theories of carcinogenesis. *Br J Cancer.* **23**, 313-328.
- Atchison L, Ghias A, Wilkinson F, Bonini N, y Atchison ML.** 2003. Transcription factor YY1 functions as a PcG protein in vivo. *EMBO J.* **22**, 1347-1358.
- Aulmann S, Bläker H, Penzel R, Rieker RJ, Otto HF, y Sinn HP.** 2003. CTCF gene mutations in invasive ductal breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* **80**, 347-352.
- Bader S, Walker M, McQueen HA, Sellar R, Oei E, Wopereis S, Zhu Y, Peter A, Bird AP, y Harrison DJ.** 2003. MBD1, MBD2 and CGBP genes at chromosome 18q21 are infrequently mutated in human colon and lung cancers. *Oncogene.* **22**, 3506-3510.
- Balmain A.** 2001. Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays. *Nat Rev Cancer.* **1**, 77-82.
- Balmain, A.** 2002. Cancer: New-age tumour suppressors. *Nature.* **417**, 235-237.
- Balmain A, Gray B, y Ponder B.** 2003. The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet.* **33**, 238-244.
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, y Zhao K.** 2007. High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell.* **129**, 823-837.
- Baylin, S.** 2005. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Practice Oncol.* **2**, S4-S11.
- Baylin S, Belinsky SA, y Herman JG.** 2000. Aberrant Methylation of Gene Promoters in Cancer--Concepts, Misconcepts, and Promise. *J Natl Cancer Inst.* **92**, 1460-1461.
- Baylin SB, y Herman JG.** 2000. DNA hypermethylation in tumorigenesis. *Trend Genet.* **16**, 168-174.
- Bird A.** 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**, 6-21.
- Bode AM, y Dong Z.** 2004. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nature.* **4**, 793-805.
- Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, Zhai Y, Giordano TJ, Qin ZS, Moore BB, MacDougald OA, Cho KR, y Fearon ER.** 2007. p53-Mediated Activation of miRNA34 Candidate Tumor-Suppressor Genes. *Curr Biol.* **17**, 1298-1307.
- Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, Saville MK, y Lane DP.** 2005. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev.* **19**, 2122-2137.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

- Boyerinas B, Park SM, Shomron N, Hedegaard MM, Vinther J, Andersen JS, Feig C, Xu J, Burge CB, y Peter ME.** 2008. Identification of Let-7-Regulated Oncofetal Genes. *Cancer Res.* **68**, 2587-2591.
- Brown SE, Fraga MF, Weaver IC, Berdasco M, y Szyf M.** 2007. Variations in DNA methylation patterns during the cell cycle of HeLa cells. *Epigenetics.* **2**, 54-65.
- Bucher, P.** 1990. Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J Mol Biol.* **212**, 563-578.
- Burgess-Beusse B, Farrell C, Gaszner M, Litt M, Mutskov V, Recillas-Targa F, Simpson M, West A, y Felsenfeld G.** 2002. The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99 Suppl 4**, 16433-16437.
- Butcher DT, Mancini-DiNardo DN., Archer TK, y Rodenhiser DI.** 2004. DNA binding sites for putative methylation boundaries in the unmethylated region of the BRCA1 promoter. *Int J Cancer.* **111**, 669-678.
- Butcher DT, y Rodenhiser DI.** 2007. Epigenetic inactivation of BRCA1 is associated with aberrant expression of CTCF and DNA methyltransferase (DNMT3B) in some sporadic breast tumours. *Eur J Cancer.* **43**, 210-219.
- Cameron EE, Bachman KE, Myöhänen S, Herman JG, y Baylin SB.** 1999. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet.* **21**, 103-107.
- Cernilogar FM, y Orlando V.** 2005. Epigenome programming by Polycomb and Trithorax proteins. *Biochem Cell Biol.* **83**, 322-331.
- Chakalova L, Debrand E, Mitchell JA, Osborne CS, y Fraser P.** 2005. Replication and transcription: shaping the landscape of the genome. *Nat Rev Genet.* **6**, 669-677.
- Chang TC, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, Feldmann G, Yamakuchi M, Ferlito M, Lowenstein CJ, Arking DE, Beer MA, Maitra A, y Mendell JT.** 2007. Transactivation of miR-34a by p53 Broadly Influences Gene Expression and Promotes Apoptosis. *Mol Cell.* **26**, 745-752.
- Chen W, Cooper TK, Zahnow CA, Overholtzer M, Zhao Z, Ladanyi M, Karp JE, Gokgoz N, Wunder JS, Andrulis IL, Levine AJ, Mankowski JL, y Baylin SB.** 2004. Epigenetic and genetic loss of Hic1 function accentuates the role of p53 in tumorigenesis. *Cancer Cell.* **6**, 387-398.
- Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, Ye W, Greer S, Marquez VE, Jones PA, y Selker EU.** 2003. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J Natl Cancer Inst.* **95**, 399-409.
- Cheng X, y Blumenthal RM.** 2008. Mammalian DNA Methyltransferases: A Structural Perspective. *Structure.* **16**, 341-350.
- Chesi M, Nardini E, Lim RS, Smith KD, Kuehl WM, y Bergsagel PL.** 1998. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood.* **92**, 3025-3034.
- Chuikov S, Kurash JK, Wilson JR, Xiao B, Justin N, Ivanov GS, McKinney K, Tempst P, Prives C, Gamblin SJ, Barlev NA, y Reinberg D.** 2004.

- Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature*. **432**, 353-360.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, y Croce CM.** 2005. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA*. **102**, 13944-13949.
- Clark SJ, Statham A, Stirzaker C, Molloy PL, Frommer M.** 2006. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *Nat Protoc*. **1**, 2353-2364.
- Cloos PA, Christensen J, Agger K, y Helin K.** 2008. Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes Dev*. **22**, 1115-1140.
- Clouaire T, y Stancheva, I.** 2008. Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? *Cell Mol Life Sci*. **65**, 1509-1522.
- Clurman B, y Mark G.** 1997. Defining tumour-suppressor genes. *Nature*. **389**, 123.
- Croce CM.** 2009. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*. **10**, 704-714.
- Croce, CM.** 2008. Oncogenes and Cancer. *N Engl J Med*. **358**, 502-511.
- Cuddapah S, Jothi R, Schones DE, Roh TY, Cui K, y Zhao K.** 2009. Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. *Genome Res*. **19**, 24-32.
- Cui H.** 2007. Loss of imprinting of IGF2 as an epigenetic marker for the risk of human cancer. *Dis Markers*. **23**, 105-112.
- Cui H, Niemitz EL, Ravenel JD, Onyango P, Brandenburg SA, Lobanenko VV, y Feinberg AP.** 2001. Loss of imprinting of insulin-like growth factor-II in Wilms' tumor commonly involves altered methylation but not mutations of CTCF or its binding site. *Cancer Res*. **61**, 4947-4950.
- Dalmay, T.** 2008. MicroRNAs and cancer. *J Int Med*. **263**, 366-375.
- Das PM, y Singal R.** 2004. DNA methylation and Cancer. *J Clin Oncol*. **22**, 4632-4642.
- De La Rosa-Velázquez IA, Rincón-Arano H, Benítez-Bribiesca L, y Recillas-Targa F.** 2007. Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. *Cancer Res*. **67**, 2577-2585.
- De Santa F, Totaro MG, Prosperini E, Notarbartolo S, Testa G, y Natoli G.** 2007. The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of Polycomb-mediated gene silencing. *Cell* **130**, 1083-1094.
- De Vos D.** 2005. Epigenetic drugs: a longstanding story. *Sem Oncol*. **32**, 437-442.
- Dean W, Lucifero D, y Santos F.** 2005. DNA methylation in mammalian development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today*. **75**, 98-111.
- Derenzini M, Montanaro L, Chillà A, Tosti E, Ceccarelli C, Dall'Olio F, Ofner D, y Treré D.** 2002. Evaluation of Thymidylate Synthase Protein Expression by Western Blotting and Immunohistochemistry on Human Colon Carcinoma Xenografts in Nude Mice. *J Histochem Cytochem*. **50**, 1633-1640.

- Djabali M, Selleri L, Parry P, Bower M, Young B, Evans GA.** 1993. A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias. *Nat Genet.* **2**, 113-118.
- Duncan EM, Muratore-Schroeder TL, Cook RG, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, y Allis CD.**2008. Cathepsin L proteolytically processes histone H3 during mouse embryonic stem cell differentiation. *Cell.* **135**, 284-294.
- Ebert A, Lein S, Schotta G, y Reuter G.** 2006. Histone modification and the control of heterochromatic gene silencing in *Drosophila*. *Chromosome Res.* **14**, 377-392.
- Edwards CA, y Ferguson-Smith AC.** 2007. Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Curr Opin Cell Biol.* **19**, 281-289.
- Ehrlich M.** 2002. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene.* **21**, 5400-5413.
- Escamilla-Del-Arenal M, y Recillas-Targa F.** 2008. GATA-1 modulates the chromatin structure and activity of the chicken  $\alpha$ -globin 3' enhancer. *Mol Cell Biol.* **28**, 575-586.
- Espinosa JM, y Emerson BM.** 2001. Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell.* **8**, 57-69.
- Esteller M, Risques RA, Toyota M, Capella G, Moreno V, Peinado MA, Baylin SB, y Herman JG.** 2001. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G:C to A:T transition mutations in *p53* in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* **61**, 4689-4692.
- Esteller, M.** 2005. Aberrant DNA methylation as a Cancer-Inducing Mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **45**, 629-656.
- Esteller, M.** 2005. Hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers. *J Pathol.* **205**, 172-180.
- Fahrner JA, Eguchi S, Herman JG, y Baylin SB.** 2002. Dependence of histone modifications and gene expression on DNA hypermethylation in cancer. *Cancer Res.* **62**: 7213-7218.
- Farrell CM, West AG, y Felsenfeld G.** 2002. Conserved CTCF insulator elements flank the mouse and human  $\beta$ -globin loci. *Mol Cell Biol.* **22**, 3820-3831.
- Feinberg AP, y Vogelstein B.** 1983. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature.* **301**, 89-92.
- Feinberg AP, Cui H, y Ohlsson R.** 2002. DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. *Semin Cancer Biol.* **12**, 389-398.
- Feinberg AP, y Tycko B.** 2004. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer.* **4**, 143-153.
- Feinberg AP, Ohlsson R, y Henikoff S.** 2006. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet.* **7**, 21-33.
- Felsenfeld G, y Groudine M.** 2003. Controlling the double helix. *Nature.* **421**, 448-453.
- Felsenfeld G, y Jin C.** 2007. Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes Dev.* **21**, 1519-1529.

- Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S.** 2006. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Gen.* **7**, 21-33.
- Feng L, Lin T, Uranishi H, Gu W, y Xu Y.** 2005. Functional analysis of the roles of posttranslational modifications at the *p53* C terminus in regulating *p53* stability and activity. *Mol Cell Biol.* **25**, 5389-5395.
- Ficz G, Heintzmann R, y Arndt-Jovin DJ.**2005. Polycomb group protein complexes exchange rapidly in living *Drosophila*. *Development.* **132**, 3963-3976.
- Filippova GN, C. M., Moore JM, Truong JP, Hu YJ, Nguyen DK, Tsuchiya KD, y Disteche CM.** 2005. Boundaries between chromosomal domains of X inactivation and escape bind CTCF and lack CpG methylation during early development. *Dev Cell.* **8**, 31-42.
- Filippova GN, Qi CF, Ulmer JE, Moore JM, Ward MD, Hu YJ, Loukinov DI, Pugacheva EM, Klenova EM, Grundy PE, Feinberg AP, Cleton-Jansen AM, Moerland EW, Cornelisse CJ, Suzuki H, Komiya A, Lindblom A, Dorion-Bonnet F, Neiman PE, Morse HC 3rd, Collins SJ, y Lobanekov VV.** 2002. Tumor-associated zinc finger mutations in the CTCF transcription factor selectively alter its DNA-binding specificity. *Cancer Res.* **62**, 48-52.
- Filippova GN, Thienes CP, Penn BH, Cho DH, Hu YJ, Moore JM, Klesert TR, Lobanekov VV, y Tapscott SJ.** 2001. CTCF-binding sites flank CTG/CAG repeats and form a methylation-sensitive insulator at the DM1 locus. *Nat Gen.* **28**, 335-343.
- Fleuriel C, Touka M, Boulay G, Guérardel C, Rood BR, y Leprince D.** 2009. HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) epigenetic silencing in tumors. *Int J Biochem Cell Biol.* **41**, 26-33.
- Fodde R, y Smits R.** 2002. Cancer biology. A matter of dosage. *Science.* **298**, 761-763.
- Ford, JM.** 2005. Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: another role for *p53*. *Mutat Res.* **577**, 195-202.
- Foulkes WD.** 2007. *p53*-Master and Commander. *N Engl J Med.* **357**, 2539-2541.
- Francis NJ, Follmer NE, Simon MD, Aghia G, y Butler JD.** 2009. Polycomb proteins remain bound to chromatin and DNA during DNA replication in vitro. *Cell.* **137**, 110-122.
- Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, y Kouzarides T.** 2000. DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet.* **24**, 88-91.
- Furlong EE, Rein T, y Martin F..** 1996. YY1 and NF1 Both activate the human *p53* promoter by alternatively binding to a composite element, and YY1 and E1A cooperate to amplify *p53* promoter activity. *Mol Cel Biol.* **16**, 167-179.
- Garzon R, Calin GA, y Croce CM.** 2009. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med.* **60**, 703-713.
- Gaszner M, y Felsenfeld. G.** 2006. Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet.* **7**, 703-713.
- Gause M, Schaaf CA, y Dorsett D.** 2008. Cohesin and CTCF: cooperating to control chromosome conformation? *BioEssays.* **30**, 715-718.

- Ghosh A, Stewart D, y Matlashewski G.** 2004. Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. *Mol Cell Biol.* **24**, 7987-7997.
- Giono LE, y Manfredi JJ.** 2006. The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *J Cell Physiol.* **209**, 13-20.
- Goll MG, y Bestor TH.** 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem.* **74**, 481-514.
- Gonzalogo M, y Jones PA.** 1997. Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. *Mutat Res.* **386**, 107-118.
- Grady WM, y Carethers JM.** 2008. Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology.* **135**, 1079-1099.
- Guelen L, Pagie L, Brassat E, Meuleman W, Faza MB, Talhout W, Eussen BH, de Klein A, Wessels L, de Laat W, y van Steensel B.** 2008. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature.* **453**, 948-951.
- Hanahan D, y Weinberg RA.** 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* **100**, 57-70.
- Hansen KH, Bracken AP, Pasini D, Dietrich N, Gehani SS, Monrad A, Rappsilber J, Lerdrup M, y Helin K.** 2008. A model for transmission of the H3K27me3 epigenetic mark. *Nat Cell Biol* **10**, 1291-1300.
- Hake SB, y Allis CD.** 2006. Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the "H3 barcode hypothesis". *Proc Natl Acad Sci USA.* **103**, 6428-6435.
- He L, He X, Lowe SW, y Hannon GJ.** 2007. MicroRNAs join the p53 network-another piece in the tumour-suppression puzzle. *Nat Rev Cancer.* **7**, 819-822.
- He L, Thomson. J.M, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, y Hammond SM.** 2005. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature.* **435**, 828-833.
- He X, He L, y Hannon GJ..** 2007. The Guardian's Little Helper: MicroRNAs in the p53 Tumor Suppressor Network. *Cancer Res.* **67**, 11099-11101.
- Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu C, Ching KA, Wang W, Weng Z, Green RD, Crawford GE, Ren B.** 2007. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet.* **39**, 311-318.
- Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, y Baylin SB.** 1996. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA.* **93**, 9821-9826.
- Hernandez-Verdun, D.** 2006. Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochem Cell Biol.* **125**, 127-137.
- Herrmann F, Lee J, Bedford MT, y Fackelmayer FO.** 2005. Dynamics of human proteinarginine methyltransferase 1(PRMT1) in vivo. *J Biol Chem.* **280**, 38005-38010.
- Hodge DR, Peng B, Cherry JC, Hurt EM, Fox SD, Kelley JA, Munroe DJ, y Farrar WL.** 2005. Interleukin 6 supports the maintenance of p53 tumor suppressor gene promoter methylation. *Cancer Res.* **65**, 4673-4682.

- Huang Y, Fang J, Bedford MT, Zhang Y, y Xu RM.** 2006. Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science*. **312**, 748-751.
- Huang J, y Berger SL.** 2008. The emerging field of dynamic lysine methylation of non-histone proteins. *Curr Opin Genet Dev*. **18**, 152-8.
- Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K.** 2009. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell*. **139**, 693-706.
- Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash JB, Sabunciyan S, y Feinberg AP.** 2009. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet*. **41**, 178-86.
- Ishihara K, Oshimura. M., y Nakao M.** 2006. CTCF-dependent chromatin insulator is linked to epigenetic remodeling. *Mol Cell*. **23**, 733-742.
- Issa JP.** 2004. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer*. **4**, 988-993.
- Janicki SM, Tsukamoto T, Salghetti SE, Tansey WP, Sachidanandam R, Prasanth KV, Ried T, Shav-Tal Y, Bertrand E, Singer RH, y Spector DL.** 2004. From silencing to gene expression: real-time analysis in single cells. *Cell*. **116**, 683-698.
- Jenuwein T, y Allis CD.** 2001. Translating the histone code. *Science*. **293**, 1074-1080.
- Jin C, Zang C, Wei G, Cui K, Peng W, Zhao K, y Felsenfeld G.** 2009. H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions. *Nat Genet*. **41**, 941-945.
- Johnson SM, G. H., Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, y Slack FJ.** 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. **120**, 635-647.
- Jones PA, y Baylin SB.** 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. **3**, 415-428.
- Jones PA, y Laird PW.** 1999. Cancer epigenetics come of age. *Nat Genet*. **21**, 163-167.
- Junéra HR, Masson C, Géraud G, y Hernandez-Verdun D.** 1995. The three-dimensional organization of ribosomal genes and the architecture of the nucleoli vary with G1, S and G2 phases. *J Cell Sci*. **108**, 3427-3441.
- Jüttermann R, Li E, y Jaenisch R.** 1994. Toxicity of 5-aza2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**, 11797-11801.
- Kang JH, Kim SJ, Noh DY, Park IA, Choe KJ, Yoo OJ, y Kang HS.** 2001. Methylation in the p53 promoter is a supplementary route to breast carcinogenesis: correlation between CpG methylation in the p53 promoter and the mutation of the p53 gene in the progression from ductal carcinoma in situ to invasive ductal carcinoma. *Lab Invest*. **81**, 573-579.



- Kantidze OL, Iarovaia OV, Philonenko ES, Yakutenko II, y Razin SV.** 2007. Unusual compartmentalization of CTCF and other transcription factors in the course of terminal erythroid differentiation. *Biochim Biophys Acta.* **1773**, 924-933.
- Kent OA, y Mendell JT.** 2006. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene.* **25**, 6188-6196.
- Kirch HC, Flaswinkel S, Rumpf H, Brockmann D, Esche H.** 1999. Expression of human p53 requires synergistic activation of transcription from the p53 promoter by AP-1, NF-kappaB and Myc/Max. *Oncogene.* **18**, 2728-2738.
- Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, Ghosh D, Sewalt RG, Otte AP, Hayes DF, Sabel MS, Livant D, Weiss SJ, Rubin MA, y Chinnaiyan AM.** 2003. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **100**, 11606-11611.
- Knudson GA.** 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **68**, 820-823.
- Ko CY, Hsu HC, Shen MR, Chang WC, y Wang JM.** 2008. Epigenetic Silencing of CCAAT/Enhancer-binding Protein delta activity by YY1/Polycomb group/DNA methyltransferase complex. *J Biol Chem.* **283**, 30919-30932.
- Kondo Y, Shen L, y Issa JP.** 2003. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. *Moll Cell Biol.* **23**, 206-215.
- Kondo Y, Shen L, Cheng AS, Ahmed S, Bumber Y, Charo C, Yamochi T, Urano T, Furukawa K, Kwabi-Addo B, Gold DL, Sekido Y, Huang TH, y Issa JP.** 2008. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet.* **40**, 741-750.
- Kubicek S, y Jenuwein T.** 2004. A crack in histone lysine methylation. *Cell.* **119**, 903-906.
- Lachner M, y Jenuwein T.** 2002. The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol.* **14**, 286-298.
- Laird PW.** 2003. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer.* **3**, 253-266.
- Laird PW.** 2005. Cancer Epigenetics. *Human Mol Gen.* **14**, R65-R76.
- Lan F, Nottke AC, y Shi Y.** 2008. Mechanisms involved in the regulation of histone lysine demethylases. *Curr Opin Cell Biol.* **20**, 316-25.
- Lane DP, y Crawford LV.** 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**, 261-263.
- Le MT, Teh C, Shyh-Chang N, Xie H, Zhou B, Korzh V, Lodish HF, y Lim B.** 2009. MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev.* **23**, 862-876.
- Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, Chevalier B, Johnstone SE, Cole MF, Isono K, Koseki H, Fuchikami T, Abe K, Murray HL, Zucker JP, Yuan B, Bell GW, Herbolsheimer E, Hannett NM, Sun K, Odom DT, Otte AP, Volkert TL, Bartel DP, Melton DA, Gifford DK, Jaenisch R, y Young RA.** 2006. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell.* **125**, 301-313.

- Liu H, Huang J, Wang J, Jiang S, Bailey AS, Goldman DC, Welcker M, Bedell V, Slovak ML, Clurman B, Thayer M, Fleming WH, y Epner E.** 2008. Transvection mediated by the translocated cyclin D1 locus in mantle cell lymphoma. *J Exp Med.* **205**, 1843-1858.
- Loh YH, Zhang W, Chen X, George J, y Ng HH.** 2007. Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells. *Genes Dev.* **21**, 2545-2557.
- Lopez-Serra, L. y M. Esteller.** 2008. Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *Br J Cancer* **98**, 1881-1885.
- Lopez-Serra L, Ballestar E, Fraga MF, Alaminos M, Setien F, y Esteller M.** 2006. A profile of methyl-cpg binding domain protein occupancy of hypermethylated promoter cpg islands of tumor suppressor genes in human cancer. *Cancer Res.* **66**, 8342-8346.
- Lu H, y Levine AJ.** 1995. Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **92**, 5154-5158.
- Lujambio A, y Esteller M.** 2007. CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer. *Cell cycle.* **6**, 1455-9.
- Lund AH, y van Lohuizen M.** 2004. Epigenetics and cancer. *Genes Dev.* **18**, 2315-2335.
- Lyko F, y Brown R.** 2005. DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. *J. Nat Cancer Inst.* **97**, 1498-1506.
- Lynch H T, y De La Chapelle A.** 2003. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med.* **348**, 919-932.
- Ma L, y Weinberg R.** 2008. MicroRNAs in malignant progression. *Cell Cycle.* **7**, 570-572.
- Mahmoudi S, Henriksson S, Corcoran M, Méndez-Vidal C, Wiman KG, y Farnebo M.** 2009. Wrap53, a Natural p53 Antisense Transcript Required for p53 Induction upon DNA Damage. *Mol Cell.* **33**, 462-471.
- Malkin D.** 2001. The role of P53 in human cancer. *J Neuro Oncol.* **51**, 231-243.
- Malumbres M, y Barbacid M.** 2003. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer.* **3**, 459-465.
- Maziere P, y Enright AJ** 2007. Prediction of microRNA targets. *Drug Discov Today.* **12**, 452-458.
- McKittrick E, Gafken PR, Ahmad K, y Henikoff S.** 2004. Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **101**, 1525-1530.
- Medina PP, y Slack F.** 2008. MicroRNAs and cancer: an overview. *Cell Cycle.* **7**, 2485-2492.
- Martinez R, Martin-Subero JI, Rohde V, Kirsch M, Alaminos M, Fernandez AF, Roper S, Schackert G, Esteller M.** 2009. A microarray-based DNA methylation study of glioblastoma multiforme. *Epigenetics.* **4**, 255-264.
- Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, Zhang X, Bernstein BE, Nusbaum C, Jaffe DB, Gnirke A, Jaenisch R, Lander ES.** 2008. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature.* **454**, 766-770.
- Moehrle A, y Paro R.** 1994. Spreading the silence: epigenetic transcriptional regulation during Drosophila development. *Dev Genet.* **15**, 478-484.

- Mojgan A, Maryam K, Farrokh T, y Shahroo EM.** 2008. Argyrophilic proteins of nucleolar organizer regions (AgNORs) in salivary gland mucoepidermoid carcinoma and its relation to histological grade. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **105**, 758-762.
- Morey Kinney SR, Smiraglia DJ, James SR, Moser MT, Foster BA, y Karpf AR.** 2008. Stage-specific alterations of DNA methyltransferase expression, DNA hypermethylation, and DNA hypomethylation during prostate cancer progression in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. *Mol Cancer Res.* **6**, 1365-1374.
- Nayak BK, y Das BR.** 1999. Differential binding of NF1 transcription factor to P53 gene promoter and its depletion in human breast tumours. *Mol Biol Reports.* **26**, 223-230.
- Ng H.** 1999. DNA methylation and chromatin modification *Curr Opin Genet Dev.* **9**, 158-163.
- Nguyen CT, Weisenberger DJ, Velicescu M, Gonzales FA, Lin JC, Liang G, y Jones PA.** 2002. Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza 2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* **62**, 7213-7218.
- Ohlsson R, Renkawitz R, y Lobanenko V.** 2001. CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet* **17**, 520-527.
- Ohlsson R, Lobanenko V, Klenova E.**2010. Does CTCF mediate between nuclear organization and gene expression? *Bioessays* **32**, 37-50..
- Paige AJ.** 2003. Redefining tumour suppressor genes: exceptions to the two-hit hypothesis. *Cell Mol Life Sci.* **60**, 2147-2163.
- Pandita TK, y Richardson C.** 2009. Chromatin remodeling finds its place in the DNA double-strand break response. *Nucleic Acids Res,* **37**, 1363-1377.
- Patel, R., y Shervington, A.** 2009. Telomerase and DNA repair in glioma. *Biochim Biophys Acta.* **1792**, 275-279.
- Patra SK, Patra A, Zhao H, Carroll P, Dahiya R.** 2003. Methyl-CpG-DNA binding proteins in human prostate cancer: expression of CXXC sequence containing MBD1 and repression of MBD2 and MeCP2. *Biochem Biophys Res Commun.* **302**, 759-766
- Paz MF, Yaya-Tur R, Rojas-Marcos I, Reynes G, Pollan M, Aguirre-Cruz L, García-Lopez JL, Piquer J, Safont MJ, Balaña C, Sanchez-Cespedes M, García-Villanueva M, Arribas L, Esteller M.** 2004. CpG island hypermethylation of DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res.* **10**, 4933-4938.
- Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, y Olivier M.** 2007. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene.* **26**, 2157-2165.
- Pfau R, Tzatsos A, Kampranis SC, Serebrennikova OB, Bear SE, y Tschlis PN.** 2008. Members of a family of JmjC domain-containing oncoproteins immortalize embryonic fibroblasts via a JmjC domain-dependent process. *Proc Natl Acad Sci USA.* **105**, 1907-12.

- Phillips JE, y Corces VG.** 2009. CTCF: master weaver of the genome. *Cell* **137**, 1194--1211.
- Pogribny IP, Pogribna M, Christman JK, y James SJ.** 2000. S. Single-site methylation within the p53 promoter region reduces gene expression in a reporter gene construct: possible in vivo relevance during tumorigenesis. *Cancer Res.* **60**, 588-594.
- Pogribny IP, y James. S.** 2002. Reduction of p53 gene expression in human primary hepatocellular carcinoma is associated with promoter region methylation without coding region mutation. *Cancer Letters* **176**, 169-174.
- Prives C, y Manfredi J.** 2005. The Continuing Saga of p53-more sleepless nights ahead. *Mol Cell.* **19**, 719-721.
- Puvion-Dutilleul F, Mazan S, Nicoloso M, Christensen ME, y Bachellerie JP.** 1991. Localization of U3 RNA molecules in nucleoli of HeLa and mouse 3T3 cells by high resolution in situ hybridization. *Eur J Cell Biol.* **56**, 178-186.
- Quon KC, y Berns A.** 2001. Haplo-insufficiency? Let me count the ways. *Genes Dev.* **15**, 2917-2921.
- Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, y Lengauer C.** 2003. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* **3**, 695-701.
- Rajagopalan H, y Lengauer. C.** 2004. Aneuploidy and cancer. *Nature.* **432**, 338-341.
- Rakha EA, Pinder SE, Paish CE, y Ellis IO..** 2004. Expression of the transcription factor CTCF in invasive breast cancer: a candidate gene located at 16q22.1. *Br J Cancer.* **91**, 1591-1596.
- Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, Spector Y, Rosenfeld N, Moskovits N, Bentwich Z, y Oren M.** 2007. Transcriptional Activation of miR-34a Contributes to p53-Mediated Apoptosis. *Mol Cell.* **26**, 731-743.
- Recillas, F.** 2002. Regulación epigenética y cáncer: la metilación del ADN y la remodelación de la cromatina. *Gaceta Biomédicas.* **8**, 9-11.
- Recillas-Targa F, De La Rosa-Velázquez IA, Soto-Reyes E, y Benítez-Bribiesca L.** 2006. Epigenetic boundaries of tumour suppressor gene promoters: the CTCF connection and its role in carcinogenesis. *J Cell Mol Med.* **10**, 554-568.
- Recillas-Targa F, Pikaart MJ, Burgess-Beusse B, Bell AC, Litt MD, West AG, Gaszner M, y Felsenfeld G.** 2002. Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta -globin insulator are separable activities. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**, 6883-6888.
- Reisman D, Elkind NB, Roy B, Beamon J, y Rotter V.** 1993. c-Myc transactivates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif. *Cell Growth Differ.* **4**, 57-65.
- Reisman D, y Rotter V.** 2004. The helix-loop-helix containing transcription factor USF binds to and transactivates the promoter of the p53 tumor suppressor gene. *Nucleic Acids Res.* **21**, 345-350.
- Resnick-Silverman L, Manfredi JJ.** 2006. Gene-specific mechanisms of p53 transcriptional control and prospects for cancer therapy. *J Cel Biochem.* **99**, 679-689.

- Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP, Lengauer C, Kinzler KW, Baylin SB, y Vogelstein B.** 2002. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature*. **416**, 552-556.
- Ringrose L, y Paro R.** 2007. Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development*. **134**, 223-232.
- Robertson KD.** 2002. DNA methylation and chromatin: Unraveling the tangled web. *Oncogene* **21**, 5361-5379.
- Robertson KD.** 2005. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Gen*. **6**, 597-610.
- Rotter V, Aloni-Grinstein R, Schwartz D, Elkind NB, Simons A, Wolkowicz R, Lavigne M, Beserman P, Kapon A, y Goldfinger N.**1994. Does wild-type p53 play a role in normal cell differentiation? *Semin Cancer Biol*. **5**, 229-236.
- Rous, P.** 1910. A transmissible avian neoplasm (sarcome of the common fowl). *J Exp Med*. **12**, 696-705.
- Rubio ED, Reiss DJ, Welcsh PL, Disteche CM, Filippova GN, Baliga NS, Aebersold R, Ranish JA, y Krumm A.** 2008. CTCF physically links cohesin to chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA*. **105**, 8309-8314.
- Ruthenburg AJ, Li H, Patel DJ, Allis CD.** 2007. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **8**, 983-994.
- Santoro R.** 2005. The silence of the ribosomal RNA genes. *Cell Mol Life Sci*. **62**, 2067-2079.
- Santos-Rosa H, y Caldas C.** 2005. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer*. **41**, 2381-2402.
- Satijn DP, Hamer KM, den Blaauwen J, y Otte AP.** 2001. The polycomb group protein EED interacts with YY1, and both proteins induce neural tissue in *Xenopus* embryos. *Mol Cell Biol*. **21**, 1360-1369.
- Sawado T, Igarashi K, y Groudine M.** 2001. Activation of beta-major globin gene transcription is associated with recruitment of NF-E2 to the  $\beta$ -globin LCR and gene promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*. **98**, 10226-10231.
- Schotta, G., A. Ebert y Reuter G.** 2003. SU(VAR)3-9 is a conserved key function in heterochromatic gene silencing. *Genetics* **117**, 149-158.
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., y Jenuwein, T.** 2004. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* **18**, 1251-1262.
- Schroeder M, y Mass MJ.** 1997. CpG methylation inactivates the transcriptional activity of the promoter of the human p53 tumor suppressor gene. *Biochem Biophys Res Commun*. **235**, 403-406.
- Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, y Cavalli G.** 2007. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax Proteins. *Cell*. **128**, 735-745.
- Scott GK, Goga A, Bhaumik D, Berger CE, Sullivan CS, y Benz CC.** 2007. Coordinate Suppression of ERBB2 and ERBB3 by Enforced Expression of Micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J Biol Chem*. **282**, 1479-1486.

- Sherr C.** 2004. Principles of tumor suppressor. *Cell*. **116**, 235-246.
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, y Shi Y.** 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. **119**, 941-953.
- Shiio Y, y Eisenman RN.** 2003. Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 13225-13230.
- Sifri R, Gangadharappa S, y Acheson LS.** 2004. Identifying and Testing for Hereditary Susceptibility to Common Cancers. *CA Cancer J Clin*. **54**, 309-326.
- Simon JA, y Lange CA.** 2008. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat Res*. **647**, 21-29.
- Sims RJ 3<sup>rd</sup>, y Reinberg D.** 2008. Is there a code embedded in proteins that is based on post-translational modifications? *Nat Rev Mol Cell Biol*. **10**, 815-820.
- Singal R, Ginder GD.** 1999. DNA methylation. *Blood*. **93**, 4059-4070.
- Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, y Hernandez-Verdun D.** 2008. Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol*. **129**, 13-31.
- Soussi T, Caron de Fromentel C, y May P.** 1990. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene*. **5**, 945-951.
- Soussi T, Ishioka C, Claustres M, y Bérout C.** 2006. Locus-specific mutation databases: pitfalls and good practice based on the p53 experience. *Nat Rev Cancer*. **6**, 83-90.
- Splinter E, Heath H, Kooren J, Palstra RJ, Klous P, Grosveld F, Galjart N, de Laat W.** 2006. CTCF mediates long-range chromatin looping and local histone modification in the beta-globin locus. *Gen Dev*. **20**, 2349-2354.
- Srinivasan L, y Atchison ML.** 2004. YY1 DNA binding and PcG recruitment requires CtBP. *Genes Dev*. **18**, 2596-2601.
- Stedman W, Kang H, Lin S, Kissil JL, Bartolomei MS, y Lieberman P.M.** 2008. Cohesins localize with CTCF at the KSHV latency control region and at cellular c-myc and H19/Igf2 insulators. *EMBO J*. **27**, 654-666.
- Stiewe T.** 2007. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. **7**, 165-168.
- Stuart ET, Haffner R, Oren M, y Gruss P.** 1995. Loss of p53 through PAX-mediated transcriptional repression. *EMBO J*. **14**, 5638-5645.
- Su CH, Shann YJ, Hsu MT.** 2008. p53 chromatin epigenetic domain organization and p53 transcription. *Mol Cell Biol*. **29**, 93-103.
- Sun X, Shimizu. H., y Yamamoto K.** 1995. Identification of a novel p53 promoter element involved in genotoxic stress-inducible p53 gene expression. *Mol Cell Biol*. **15**, 4489-4496.
- Takeuchi T, Watanabe Y, Takano-Shimizu T, y Kondo S.** 2006. Roles of jumonji and jumonji family genes in chromatin regulation and development. *Dev Dyn*. **235**, 2449-2459.
- Thomas, M.J. y Seto, E.** 1999. Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key? *Gene*. **236**, 197-208.
- Tiwari VK, Cope L, McGarvey KM, Ohm JE, y Baylin SB.** 2008. A novel 6C assay uncovers Polycomb-mediated higher order chromatin conformations. *Genome Res*. **18**, 1171-1179.

- Tolmachev V.** 2008. Imaging of HER-2 overexpression in tumors for guiding therapy. *Curr Pharm Des.* **14**, 2999-3019.
- Torrano V, Navascués J, Docquier F, Zhang R, Burke LJ, Chernukhin I, Farrar D, León J, Berciano MT, Renkawitz R, Klenova E, Lafarga M, y Delgado MD.** 2006. Targeting of CTCF to the nucleolus inhibits nucleolar transcription through a poly(ADP-ribosyl)ation-dependent mechanism. *J Cell Sci.* **119**, 1746-1759.
- Treré D, Ceccarelli C, Montanaro L, Tosti E, y Derenzini M.** 2004. Nucleolar Size and Activity Are Related to pRb and p53 Status in Human Breast Cancer. *J Histochem Cytochem.* **52**, 1601-1607.
- Tsang WP, y Kwok T.** 2008. Let-7a microRNA suppresses therapeutics-induced cancer cell death by targeting caspase-3. *Apoptosis* **13**, 1215-1222.
- Tuck SP, y Crawford L.** 1989. Characterization of the human p53 gene promoter. *Mol Cell Biol.* **9**, 2163-2172.
- Turner BM.** 2007. Defining an epigenetic code. *Nat Cell Biol* **9**, 2-6.
- Urdinguio RG, Lopez-Serra L, Lopez-Nieva P, Alaminos M, Diaz-Uriarte R, Fernandez AF, Esteller M.** 2008. Mecp2-Null Mice Provide New Neuronal Targets for Rett Syndrome. *PLoS ONE.* **3**, e3669.
- Valadez-Graham V, Razin SV, y Recillas-Targa F.** 2004. CTCF-dependent enhancer blockers at the upstream region of the chicken alpha-globin gene domain. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1354-1362.
- Van der Vlag J, y Otte AP.** 1999. Transcriptional repression mediated by the human polycomb-group protein EED involves histone deacetylation. *Nat Genet.* **23**, 474-478.
- Varambally S, Dhanasekaran. S., Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA, y Chinnaiyan AM** (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* **419**, 624-629.
- Varambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, Ateeq B, Laxman B, Cao X, Jing X, Ramnarayanan K, Brenner JC, Yu J, Kim JH, Han B, Tan P, Kumar-Sinha C, Lonigro RJ, Palanisamy N, Maher CA, y Chinnaiyan AM.** 2008. Genomic Loss of microRNA-101 Leads to Overexpression of Histone Methyltransferase EZH2 in Cancer. *Science.* **322**, 1695-1699.
- Varmus HE, Vogt P, y Bishop JM.** 2008. The classic: integration of deoxyribonucleic acid specific for Rous sarcoma virus after infection of permissive and nonpermissive hosts: (RNA tumor viruses/reassociation kinetics/duck cells). 1973. *Clin Orthop Relat Res.* **466**, 2031-2038.
- Venanzoni MC, Robinson. L., Hodge DR, Kola I, y Seth A.** 1996. ETS1 and ETS2 in p53 regulation: spatial separation of ETS binding sites (EBS) modulate protein: DNA interaction. *Oncogene.* **12**, 1199-1204.
- Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, y Fuks F.** 2006. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature.* **439**, 871-874.
- Vogelstein B, Lane D, y Levine A.** 2000. Surfing the p53 network. *Nature.* **408**, 307-310.

- Wallace JA, y Felsenfeld. G.** 2007. We gather together: insulators and genome organization. *Curr Opin Genet Dev.* **17**, 400-407.
- Wang GG, Allis. C.D, y Chi P.** 2007. Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications. *Trends Mol Med.* **13**, 363-372.
- Watanabe Y, Tomita M, y Kanai A.** 2007. Computational Methods for MicroRNA Target Prediction. *Methods Enzym.* **427**, 65-86.
- Watt F, y Molloy P.** 1998. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev.* **2**, 1136-1143.
- Weber B, Stresemann. C., Brueckner B, y Lyko F.** 2007. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle.* **6**, 1001-1005.
- Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, y Schübeler D.** 2007. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet.* **39**, 457-466.
- Wendt KS, Peters JM.** 2009. How cohesin and CTCF cooperate in regulating gene expression. *Chromosome Res.* **17**, 201-214.
- Wendt KS, y Peters JM.** 2009. Disruption of retinoblastoma protein function by coexpression of its C pocket fragment. *Genes Dev.* **9**, 31-46.
- Williams, A., y Flavell, R. A.** 2008. The role of CTCF in regulating nuclear organization. *J Exp Med.* **205**, 747-750.
- Witcher M, y Emerson BM.** 2009. Epigenetic silencing of the p16(INK4a) tumor suppressor is associated with loss of CTCF binding and a chromatin boundary. *Mol Cell.* **34**, 271-84.
- Wolffe AP.** 1994. Transcriptional activation. Switched-on chromatin. *Curr Biol.* **4**, 525-528.
- Xiang Y, Zhu Z, Han G, Lin H, Xu L, y Chen CD.** 2007. JMJD3 is a histone H3K27 demethylase. *Cell Res.* **17**, 850-857.
- Yamane K, Toumazou C, Tsukada Y, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wong J, y Zhang Y.** 2006. JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell.* **125**, 483-495.
- Yang Y, y Fu LM.** 2003. TSGDB: a database system for tumor suppressor genes. *Bioinformatics.* **19**, 2311-2312.
- Yap DB, Hsieh JK, Chan FS, y Lu X.** 1999. mdm2: a bridge over the two tumour suppressors, p53 and Rb. *Oncogene.* **18**, 7681-7689.
- Yusufzai TM, Tagami H, Nakatani Y, y Felsenfeld G.** 2004. CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *Mol Cell.* **13**, 291-298.
- Zhang R, Burke LJ, Rasko JE, Lobanenko V, y Renkawitz R.** 2004. Dynamic association of the mammalian insulator protein CTCF with centrosomes and the midbody. *Exp Cell Res.* **294**, 86-93.
- Zhu Y, Spitz MR, Zhang H, Grossman HB, Frazier ML, y Wu X.** 2004. Methyl-CpG-binding domain 2. *Cancer.* **100**, 1853-1858.
- Zlatanova J, y Caiafa P.** 2009. CTCF and its protein partners: divide and rule? *J Cell Sci.* **122**, 1275-1284.
- Zilberman D, Gehring M, Tran RK, Ballinger T, y Henikoff S.** 2007. Genome-wide analysis of Arabidopsis thaliana DNA methylation uncovers an



interdependence between methylation and transcription. *Nat Genet.* **39**, 61-69.

## **BIBLIOGRAFÍA ELECTRÓNICA.**

**High-Resolution profiling of histone methylations in the human genome**

**(NHLBI Division of intramural research, laboratory of molecular**

**immunology) <http://dir.nhlbi.nih.gov/papers/lmi/epigenomes/hgtcell.aspx>**

**Organización Mundial de la Salud (OMS) [www.who.int/es/](http://www.who.int/es/)**

**ATCC: The global Bioresource Center [www.atcc.org](http://www.atcc.org)**

# **ARTICULOS PUBLICADOS**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## ORIGINAL ARTICLE

# Epigenetic regulation of the human p53 gene promoter by the CTCF transcription factor in transformed cell lines

E Soto-Reyes and F Recillas-Targa

*Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Genética Molecular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México*

Epigenetic silencing of tumor suppressor gene promoters has become a more frequent phenomenon in cancer than previously anticipated. In this study we addressed the mechanisms involved in the protection of the p53 tumor suppressor gene against epigenetic silencing in human transformed cell lines. We characterized a binding site for the CCCTC-binding factor (CTCF) in the human p53 gene promoter that contributes to its transcriptional expression, and has the ability to maintain this regulatory element in a local open chromatin configuration. In the absence of CTCF we observe the incorporation of repressive histone marks, such as H3K9me3, H3K27me3 and H4K20me3, in different sub-domains of the upstream regulatory sequence. This evidence suggests that CTCF protects the p53 gene promoter against repressive histone marks. Notably, no apparent direct correlation between repression and DNA hypermethylation has been detected. Together, we present evidence supporting the relevant role of CTCF in the epigenetic regulation of tumor suppressor genes and cancer. We propose that CTCF is a strategic component responsible for the maintenance and segregation of epigenetic traits.

*Oncogene* advance online publication, 25 January 2010; doi:10.1038/onc.2009.509

**Keywords:** tumor suppressor gene; CTCF; epigenetics; DNA methylation; p53 human promoter and histone covalent modifications

## Introduction

From an epigenetic perspective, the study of tumor suppressor genes has become notably relevant due to the fact that deregulation of these genes is associated with tumorigenic processes (Jones and Baylin, 2007). In particular, 70% of human genes are linked to promoters that contain CpG islands that are the target of abnormal epigenetic events (Antequera, 2003; Issa, 2004). On the basis of recent proposals, the CpG island can be

cataloged as a low, intermediate or high CpG island (Weber *et al.*, 2007). High CpG islands have been linked to housekeeping gene promoters that are normally unmethylated, whereas low CpG islands are associated with tissue-specific gene promoters that can be methylated, apparently without affecting their regulatory potential. This classification demands novel interpretations depending on the nature of the CpG island, as a distinct combination of epigenetic silencing mechanisms can now be expected (Weber *et al.*, 2007; Kondo *et al.*, 2008; Meissner *et al.*, 2008). For example, the high CpG island promoters are more frequently silenced by DNA methylation in abnormal conditions, even though histone repressive marks, such as H3 lysine 9 trimethylation (H3K9me3), can also be incorporated (McGarvey *et al.*, 2006; Kondo *et al.*, 2008). In contrast, intermediate and low CpG islands can be silenced by covalent histone modifications such as H3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) (Kondo *et al.*, 2008), and not by DNA methylation. Thus, H3K27me3 and DNA methylation can exert an effect independently, and their aberrant promoter targets seem to be defined by the CpG content (Weber *et al.*, 2007; Kondo *et al.*, 2008).

In this study we assessed the mechanisms of epigenetic silencing of the human p53 tumor suppressor gene in cancer cells. On the basis of recently established definitions, we consider the human p53 promoter to correspond to an ICP island that is apparently not frequently silenced by DNA methylation (Pogribny *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2001; Amatya *et al.*, 2005). We hypothesize that different classes of CpG islands might be regulated differently, not only at the level of DNA methylation and/or Polycomb family members but also in terms of selective and differential use of transcription factors. In accordance, in this study we address whether different kinds of CpG island promoters are epigenetically regulated by alternative mechanisms (De La Rosa-Velázquez *et al.*, 2007). We found that the multifunctional CCCTC-binding site factor (CTCF) is involved in p53 epigenetic regulation by harboring an open chromatin configuration. Remarkably, p53 gene promoter epigenetic silencing is not dependent on DNA methylation. Instead, repressive histone modifications are enriched and represent the main cause of silencing in the presence of reduced levels of CTCF. We propose a model in which CTCF can overcome epigenetic silencing not only by counteracting DNA methylation (as in the case of *Rb* and other

Correspondence: Dr F Recillas-Targa, Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Genética Molecular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, Mexico City, D.F., 04510, México.

E-mail: frecilla@ifc.unam.mx

Received 18 May 2009; revised 3 December 2009; accepted 13 December 2009

or suppressor gene promoters) but also by blocking incorporation of repressive covalent histone modifications.

## Results

### Gene expression and epigenetic profiles of the human p53 gene in epithelial cell lines

On the basis of predicted differences in p53 gene expression in transformed epithelial cell lines, we decided to explore these differences and correlate them with their chromatin structural status with the aim of finding a model system for p53 epigenetic silencing. We first characterized the expression profile of the p53 gene using reverse transcriptase PCR (RT-PCR) in SW480, HeLa, K562, and K569 epithelial cell lines and in a primary culture of normal fibroblasts obtained from neonatal foreskin (Figure 1a). We found that the colorectal adenocarcinoma SW480 cells show the highest levels of expression, followed by HeLa and K562 cell lines, when compared with the primary culture of normal fibroblasts.

To analyze the relationship between p53 gene expression and its epigenetic entourage, we next evaluated the DNA methylation status of the p53 gene promoter by sodium bisulfite conversion assay (Figure 1b). No DNA methylation was detected at the p53 gene core promoter in any of the cell lines studied. We then evaluated the patterns of histone covalent modifications over the p53 gene promoter. We found that the histone H3K4me2 modification and the polyacetylation of histone H3 and H4 are drastically enriched in SW480 cells (Figure 1c). To corroborate the *in situ* chromatin status of the promoter we performed a restriction enzyme accessibility assay (Escamilla-Del-Arenal and Recillas-Targa, 2008) (Figure 1d). The results of these experiments are in accordance with the previous assays, and they show that the p53 gene promoter has an open chromatin conformation in the SW480 cell line, whereas HeLa and K562 cell lines show a more compacted chromatin structure (Figure 1d). Taken together, these results suggest that p53 gene expression regulation in normal and cancer cells can be influenced not only by ubiquitous or stage-specific transcription factors, but also by the chromatin configuration of its promoter.

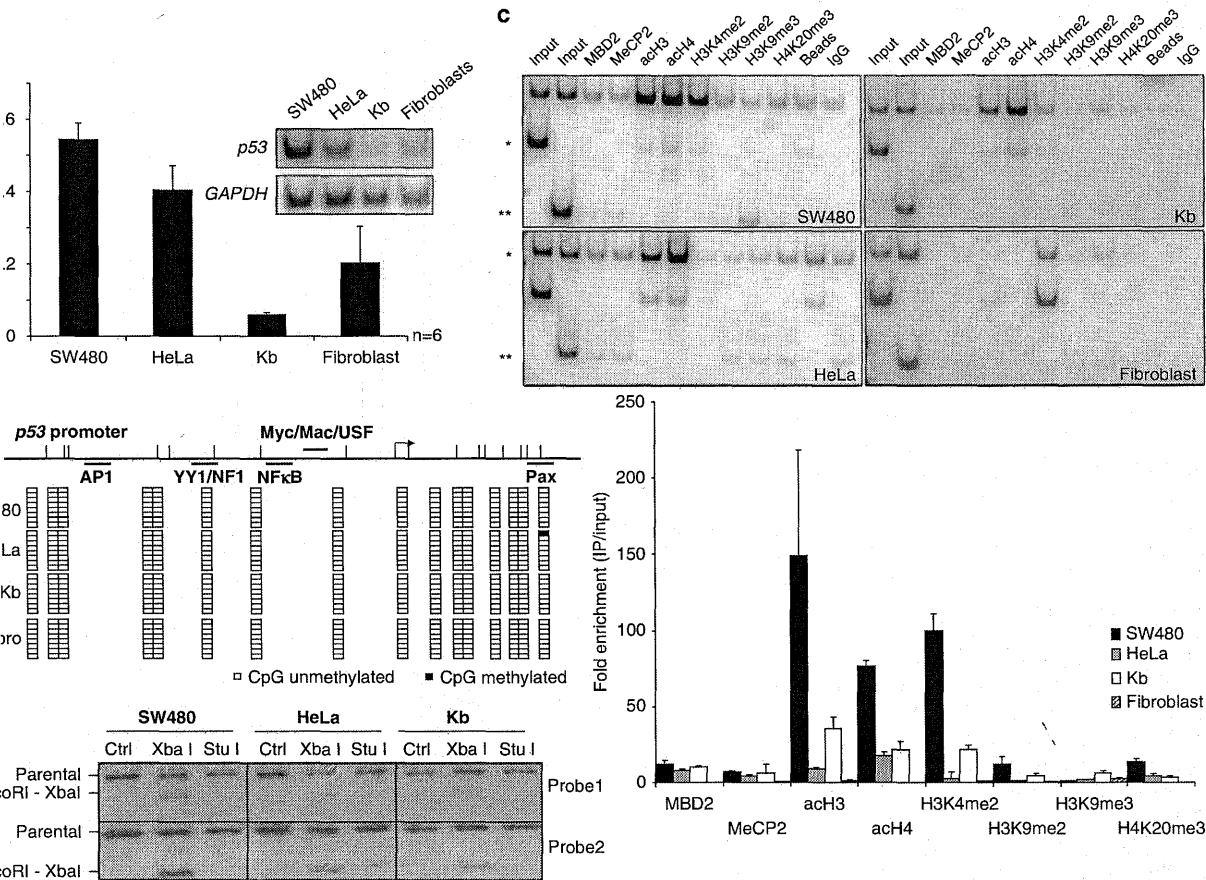
### Epigenetic silencing model for the p53 gene promoter in glioma cell lines

We next decided to explore other cell types that have been reported to show DNA methylation over the p53 gene promoter (Amatya *et al.*, 2005). We first evaluated protein abundance by immunofluorescence in T98G and U87MG glioma cell lines (Figure 2a). The absence of p53 in these two glioma cell lines was confirmed (Figures 2a and b). To evaluate their DNA methylation status, cells were treated with the methylation inhibitor, 5-aza-2'-deoxycytidine, for 72 h. Immunofluorescence, Western blotting and quantitative RT-PCR assays showed a marginal reactivation of p53 expression (Figure 2), most notably in the treated T98G cells.

Surprisingly, when we performed a sodium bisulfite conversion assay and sequencing using primers located in the core promoter we were not able to detect any DNA methylation (Figure 3a, site 4, and Supplementary Figure 1). On the basis of such unexpected result we decided to survey the DNA methylation status of a larger genomic area in T98G cells (Figure 3a). In all, seven DNA sub-fragments were analyzed using sodium bisulfite conversion and sequencing, including upstream genomic sequences in relation to the p53 transcription start site and CpG-rich intronic sequences (Figure 3a and Supplementary Figure 1). As positive controls we tested two unrelated genomic sequences known to possess different levels of DNA methylation and *in vitro* methylated genomic DNA (Supplementary Figure 2). One more time, this extended analysis did not allow the identification of any DNA methylation. These results confirm on one side that p53 gene expression can be reactivated using the DNA methylation inhibitor in glioma cell lines, and on the other, that the core promoter and surrounding sequences in a range of 3 kb are hypomethylated. Therefore, these two glioma cell lines may represent a cancer cell context in which p53 epigenetic silencing can be studied, and whether the presence of CTCF contributes to such a process can also be explored.

### In vitro and in vivo binding of CTCF to the upstream region of the human p53 gene promoter

On the basis of our previous report suggesting that CTCF is able to counteract epigenetic silencing events in the human *Rb* gene promoter, we decided to verify whether such a mechanism is conserved in other tumor suppressor genes, and particularly for p53 (De La Rosa-Velázquez *et al.*, 2007). We found a putative CTCF-binding motif in a DNA fragment located at ~700 bp upstream of the p53 transcription start site (Figure 3a) (De La Rosa-Velázquez *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007). We performed a gel shift analysis using total extracts from HeLa cells to determine whether CTCF associates with this sequence *in vitro* (Figure 3b). We next carried out a chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay using an antibody against human CTCF and by using primers that flank the novel CTCF-binding sequence in several cell lines. As a negative amplification control we used the exon 27 of the *Rb* gene, as reported previously (De La Rosa-Velázquez *et al.*, 2007). Interestingly, we observed enrichment of the CTCF immunoprecipitated fraction in SW480 and HeLa cell lines, but not in the U87MG and T98G glioma cell lines in which p53 gene expression is silenced (Figure 3c). We then repeated the ChIP assay by treating the T98G cells with and without 5-aza-2'-deoxycytidine and found the reincorporation of CTCF, consistent with p53 gene expression activation (Figure 3d). It is noteworthy that in this context CTCF binding does not seem to be methylation sensitive as the CpGs present on its binding sequence are not methylated (Supplementary Figure 1, site 3). Therefore, CTCF binding perturbation by DNA methylation is probably guided by an indirect mechanism. Together, these results



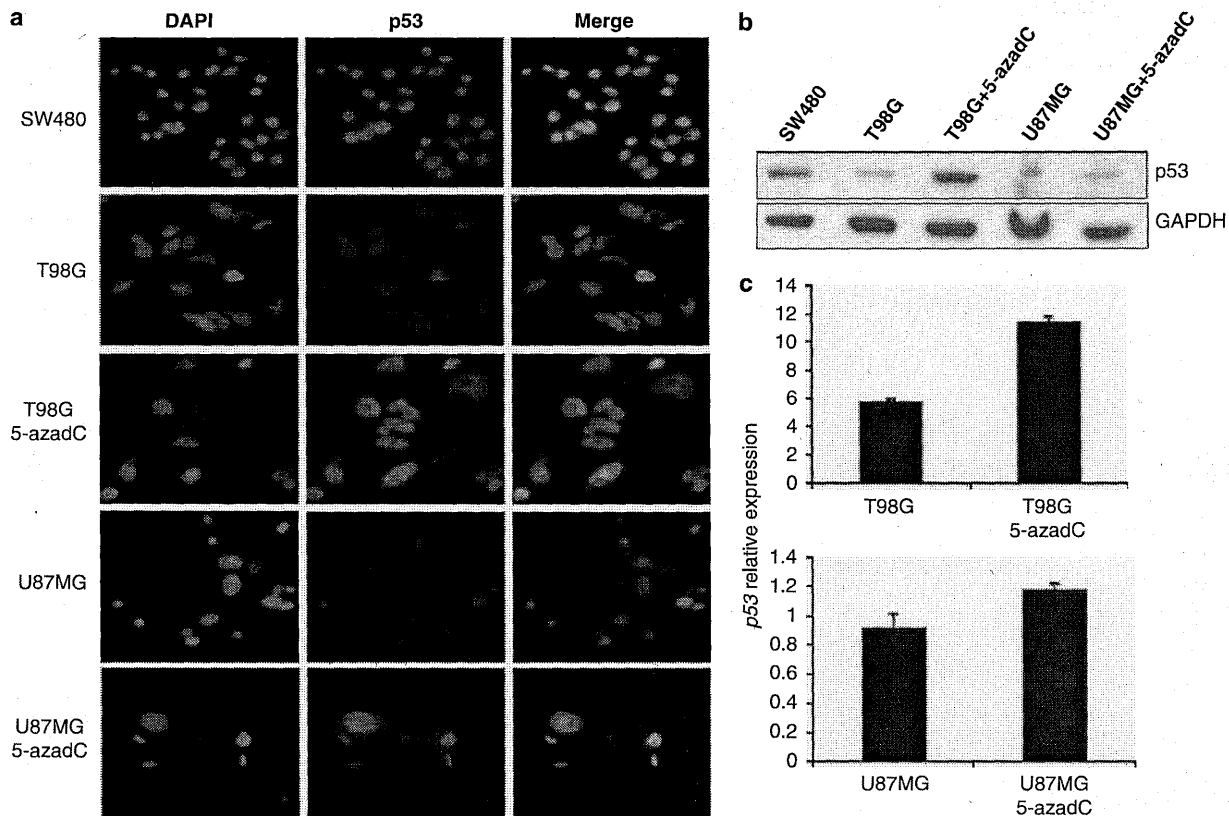
**Figure 1** Differential chromatin structure and gene expression in distinct epithelial cell lines. (a) Expression profile of the human *p53* gene in: SW480, a human colon adenocarcinoma cell line; HeLa, a human cervical cancer cell line; Kb, a human epidermoid carcinoma cell line; and fibroblasts from primary cell culture of human fibroblasts isolated from neonatal foreskin. Duplex RT-PCR was performed and data normalized against *GAPDH* expression from six independent experiments. (b) DNA methylation status of the core *p53* gene promoter in several cell lines. At least eight independent clones were sequenced. Fibro represents primary cell cultures of human neonatal foreskin. Positive controls of the sodium bisulfite transformation of genomic DNA are shown in Supplementary Figure 2. (c) Chromatin immunoprecipitation assay using antibodies that recognize active and repressive histone marks. Two methyl-CpG-binding protein antibodies are incorporated in the study (MBD2 and MeCP2). Semi-quantitative values were determined using radioactive duplex-PCR and a representative gel is shown for each cell type (upper panel). Relative enrichment of histone covalent modifications was plotted and the fold enrichment values of at least two independent immunoprecipitations are shown. Each duplex-PCR was performed in triplicate using primers from the *p53* core promoter, and standard error is presented (lower panel). For normalization we used  $\beta$ -actin (\*) for the close histone marks and *MyoD* for open histone marks (\*\*). (d) *In situ* restriction enzyme accessibility assay. Probe 1 corresponds to an upper band probe and Probe 2 to the opposite strand. The *Xba*I site is roughly located at the center of the core promoter, and *Stu*I restriction site is used as control for complete enzymatic digestion. This is a representative Southern blot from two independent assays.

confirmed CTCF association with the human *p53* promoter region and its dissociation in glioma cells.

#### CTCF and its epigenetic role in glioma cell lines

In the aim of further assessing the role of CTCF in gene regulation, we performed ChIP assays using antibodies against active and repressive histone marks in glioma cell lines (Figure 4). We confirmed the dissociation of CTCF binding and the enrichment at the core promoter of the H4K20me3 and H3K27me3 repressive marks (Figure 4). This result is not due to the depletion of CTCF, as in all the cell lines tested, including glioma cells, we observed CTCF nuclear localization by

immunofluorescence assays (data not shown). This argues in favor of a local modification or displacement of CTCF by unexplored mechanisms (Figure 3d). Surprisingly, when the DNA methylation status of the upstream sequences was analyzed in U87MG and T98G cells, we basically found no DNA methylation (Figure 3a, sites 1–3, and data not shown). It is possible that in glioma cell lines, other and more distal genomic sequences that are DNA methylated can directly or indirectly be responsible for *p53* silencing. Alternatively, we do not discard that DNA methylation is affecting the expression of a co-regulator of CTCF, such as the poly-ADP-ribosyl polymerase 1 (Yu *et al.*, 2004 and see Discussion). As shown, histone modifications, in



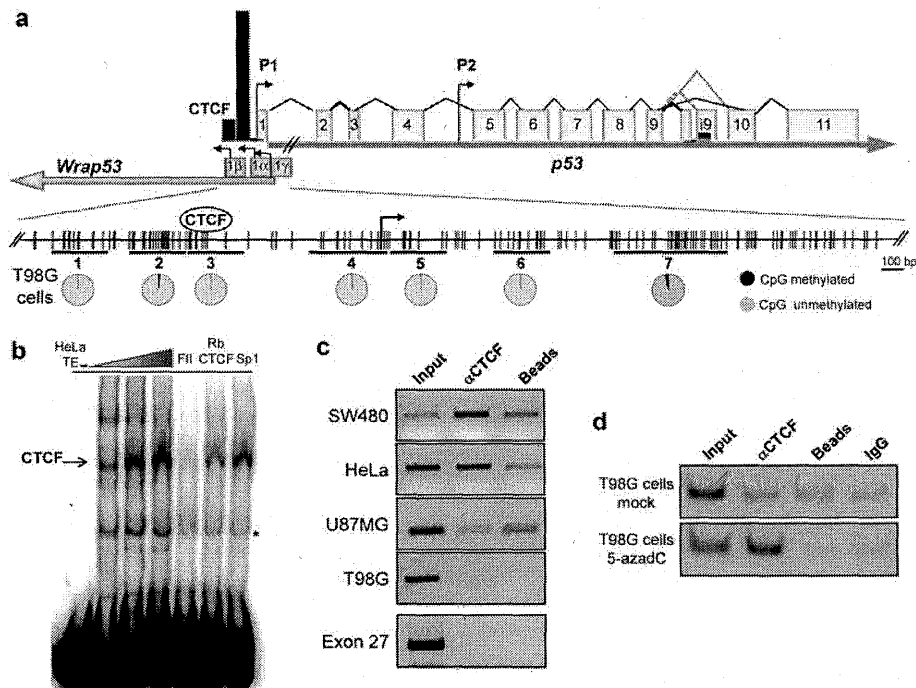
**Figure 2** DNA methylation of the *p53* promoter region in glioma cell lines. (a) Immunofluorescence against the *p53* protein in T98G and U87MG glioma cells treated with the DNA methylation inhibitor, 5-aza-2'-deoxycytidine (5-azadC). For comparison, SW480 cells were incorporated in this study. (b) Western blot analysis of the glioma cells incubated or not with 5-azadC. (c) Expression profiles of the *p53* gene in glioma cells lines treated with and without 5-azadC evaluated using quantitative RT-PCR.

particular H3K27me3, are contributing to *p53* silencing in glioma cells. These results are in agreement with findings by Issa and collaborator (Kondo *et al.*, 2008), in which histone H3K27me3 among other repressive histone marks may have a major role in epigenetic silencing.

#### Functional contribution of CTCF to human *p53* promoter activity

To evaluate the functional contribution of CTCF to the regulation of *p53* gene expression, we generated a stable HeLa knockdown cell line against CTCF (HeLa-kd-CTCF) using a small hairpin RNA (Ishihara *et al.*, 2006). HeLa cells were chosen because they show an intermediate level of expression, between SW480 cells and primary normal fibroblasts (Figure 1a). In addition, HeLa cells were used in our previous analysis to show the epigenetic contribution of CTCF to human retinoblastoma gene regulation (De La Rosa-Velázquez *et al.*, 2007). Thus, CTCF knockdown will allow us to perform a comparative analysis between *p53* and *Rb* gene expression profiles. As a control, we stably transfected HeLa cells with an empty vector and a scramble small hairpin RNA that exerts no effect on either CTCF or

cellular integrity (Supplementary Figure 3). We performed immunofluorescence and western blot assays to corroborate the reduction of CTCF levels (Figure 5a). We further evaluated the expression patterns of *p53* using RT-PCR, and of *Rb* for comparison, as well as their peptide products in the CTCF knockdown cell line (Figures 5b and c). We found a drastic reduction in the expression levels of both tumor suppressor genes. With the aim of obtaining a comparative overview of *p53* gene expression profiles in the context of the CTCF knockdown cells and cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine and the poly(ADP-ribosyl)-polymerase inhibitor 3-aminobenzamide we determined the relative abundance of *p53* mRNA (Figure 5d). We confirmed the lack of expression in HeLa knockdown and glioma cells. 3-Aminobenzamide was incorporated to the study based on the fact that it is well established that CTCF activity can be modulated by poly(ADP-ribosyl)ation (Yu *et al.*, 2004; Docquier *et al.*, 2009). Importantly, we found that poly(ADP-ribosyl)ation inhibition affects *p53* gene expression probably perturbing CTCF activity. These data correlate with the notable absence of p53 and Rb proteins synthesis, and it shows the relevant role of CTCF in the regulation of two key tumor suppressor genes.



**Figure 3** DNA methylation of the human *p53* promoter region and *in vitro* and *in vivo* association of the CTCF-binding factor. (a) Scheme representation of the *p53* and *Wrap53* genomic domains showing the position of promoters, exons and CpG islands. The *in vivo* CTCF binding sites reported by University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser are shown (black vertical bars; Barski *et al.*, 2007). P1 represents the main *p53* promoter and P2 symbolizes the alternative promoter. Below we incorporated a detailed scheme of the genomic organization of ~3 kb upstream regulatory regions and first intron of the human *p53* gene is also shown. Vertical lines represent CpG dinucleotides, and DNA methylation, determined by sodium bisulfite conversion in T98G glioma cells, using seven different sets of primers is shown. DNA methylation percentage of each site is plotted as a pie graph ( $n = 8$ ). Individual CpG sites are shown in the Supplementary Figure 1 and controls in Supplementary Figure 2. (b) A gel shift assay using total cell extracts from HeLa cells (HeLa TE) and a 75-bp labeled probe is shown. The specificity of the interaction was confirmed using the chicken *chS4*  $\beta$ -globin insulator CTCF-binding site and Rb-CTCF binding site as competitors and as non-specific competitor, the consensus sequence for the ubiquitous Sp1 transcription factor. The asterisk defines a nonspecific retarded complex. (c) ChIP assays were carried out on different cell lines, including the two glioma cell lines. As a negative amplification control we used primers from exon 27 of the human retinoblastoma gene (De La Rosa-Velázquez *et al.*, 2007). (d) ChIP assays were performed on T98G glioma cells, untreated (T98G mock) and treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-azadC). Linear range of amplification conditions was determined using the input material (not shown). Beads and an anti-IgG were included as negative controls.

### Global effects of distinct histone marks in HeLa and HeLa CTCF knockdown cells

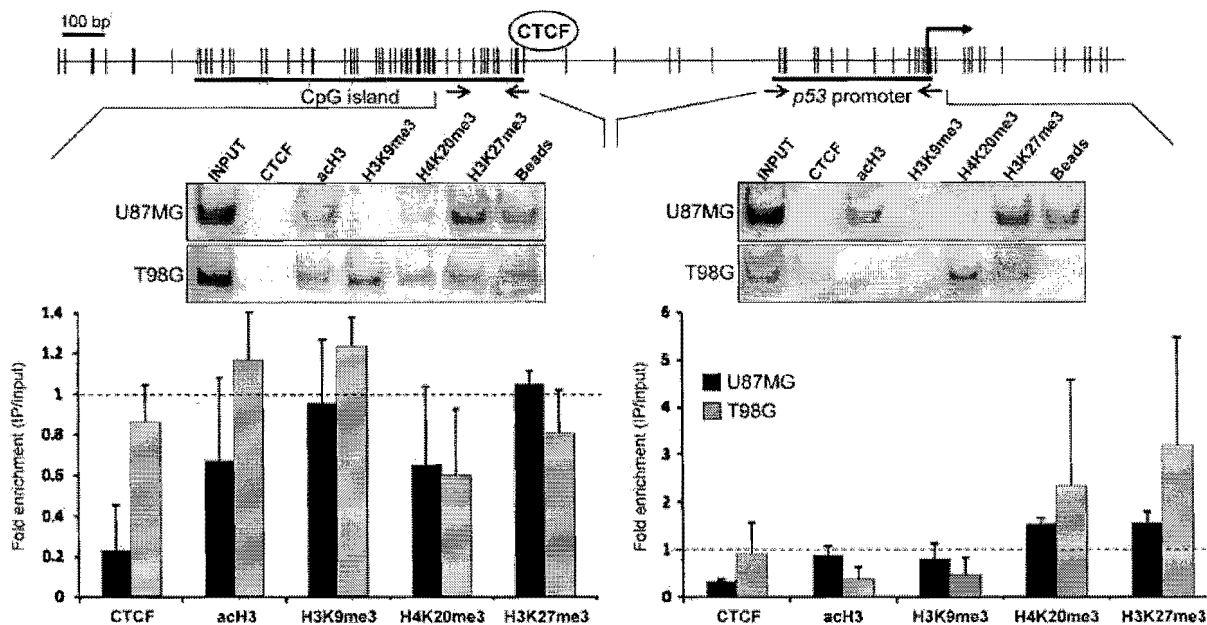
Recent evidence has uncovered CTCF as an important factor involved in the maintenance of nuclear architecture (Guelen *et al.*, 2008; Williams and Flavell, 2008). Using immunofluorescence assays, we compared the nuclear distribution of different histone covalent modifications in HeLa and HeLa-kd-CTCF cell lines (Supplementary Figure 4). In HeLa cells we observed an enrichment of the speckled-like pattern of H3K9me3, H3K27me3 and H4K20me3 distribution that could correspond to different heterochromatic genomic regions (Schotta *et al.*, 2004). However, in the CTCF knockdown cellular context, we observed a clear redistribution of heterochromatin foci. This general chromatin reorganization associated with CTCF reduction may directly or indirectly contribute to abnormal downregulation of *p53* and *Rb* by having a role in the loss of their higher-order organization inside the nucleus.

### Local chromatin structural perturbations in HeLa cells deficient in CTCF

We next analyzed the genomic sequences surrounding the CTCF-binding site and the *p53* core promoter in terms of histone covalent modifications (Figure 6). Concerning the chromatin structure of the most upstream area, we found an enrichment of histone H3K9me3 and H4K20me3 in HeLa knockdown cells, along with a notable diminishment of histone H3 acetylation (Figure 6). Interestingly, when we focused in the core promoter, there were no changes in histone H3 acetylation, but there was a modest increase in H3K9me3, H4K20me3 and particularly H3K27me3 repressive histone marks (Figure 6). At this point it is worth mentioning that the histone H3K27me3 mark is exclusively found to be associated with the core *p53* promoter in HeLa knockdown cells and T98G glioma cells (see Figure 4).

These results establish that the *p53* promoter seems to be organized into different sub-domains in which CTCF





**Figure 4** Epigenetic changes induced by CTCF absence from the human *p53* promoter in glioma cell lines. ChIP assay showing the absence of CTCF over the *p53* promoter in T98G and U87MG glioma cell lines. Horizontal dotted line shows the input value (normalized to 1).

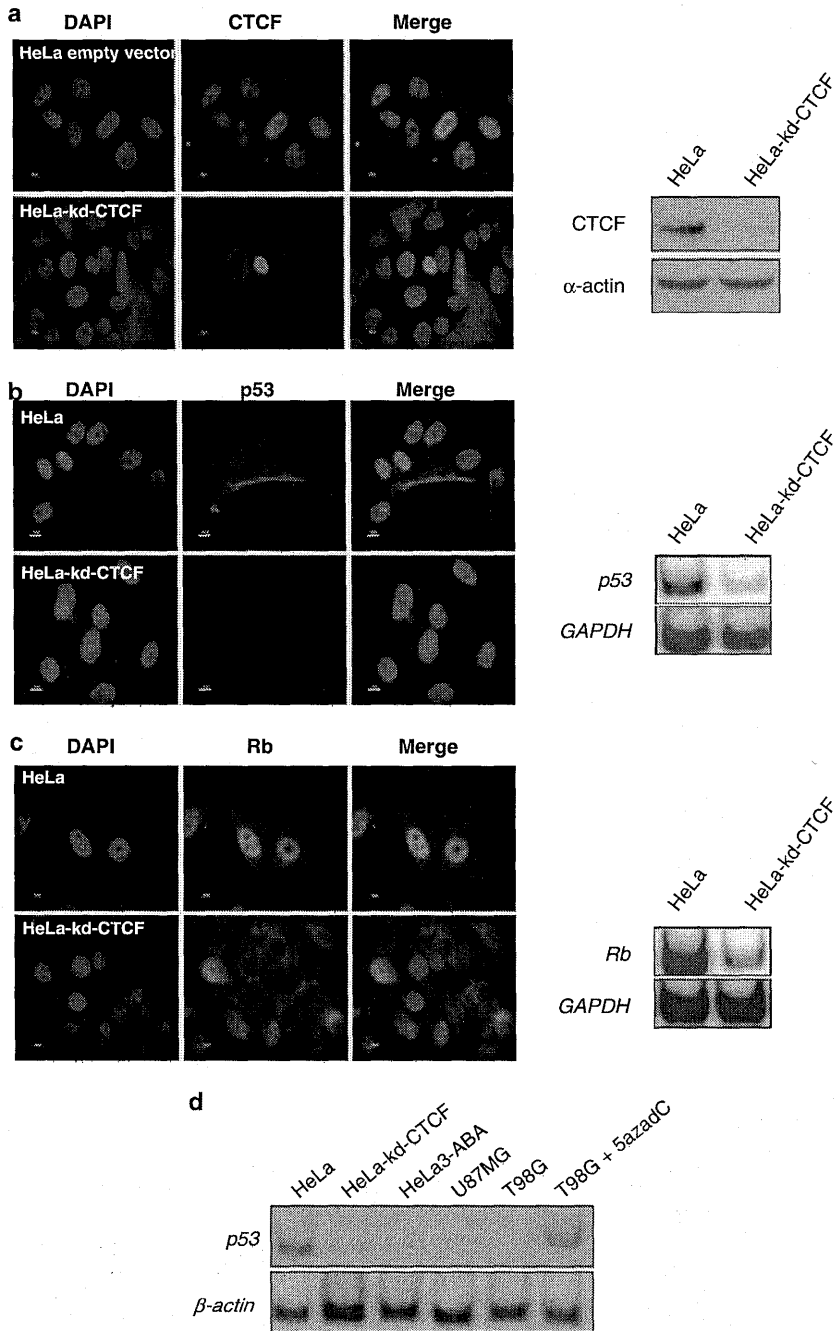
seems to have a delimiting role, and that its absence induces the incorporation of differential repressive marks, such as the Polycomb-associated histone H3K27me3 mark, over the *p53* core promoter.

### Discussion

In this study we analyzed epigenetic events leading to the silencing of the *p53* gene promoter. We propose that CTCF has a critical role in *p53* gene promoter epigenetic regulation shielding the promoter against the incorporation of repressive covalent histone modifications and that the mechanisms of silencing may be, at least in part, dependent on the type of CpG island that is present. Thus, CTCF dissociation may induce dramatic and anomalous epigenetic defects leading to cancer development.

A novel aspect that emerges from our study in epithelial transformed cell lines is that the human *p53* promoter seems to be in a relatively closed chromatin configuration in normal cells, and that a robust chromatin structural relaxation is associated with *p53* gene expression in some tumor cell lines (Figure 1). This observation may suggest that in normal conditions *p53* gene expression is in some way negatively regulated through epigenetic mechanisms. Therefore, to respond to different stimuli, on one hand, the *p53* promoter needs to possess specific and efficient procedures to remodel its chromatin structure to enable transcription, and on the other, as clearly established, it can be regulated at the protein level (Vazquez *et al.*, 2008; Vousden and Prives, 2009).

It seems that CTCF binds to tumor suppressor gene promoters, such as the *p53* or *Rb* promoters, and more recently *p16<sup>INK4a</sup>*, contributing to their epigenetic integrity (De La Rosa-Velázquez *et al.*, 2007; Witcher and Emerson, 2009). This evidence argues in favor of the association of other factors and co-factors that cooperate with CTCF in different contexts, for example, poly(ADP-ribose) polymerase 1, brahma-related gene 1 (Su *et al.*, 2009) and chromatin remodeling factors, such as histone acetyltransferases and histone methyltransferases, which counteract repressive and abnormal epigenetic signals in a coordinated manner. In contrast, the absence of one of these components, but mainly the dissociation or absence of CTCF, induces a rapid epigenetic silencing of gene promoters associated with it. Several mechanisms for CTCF dissociation can be envisioned. One possibility comes from CTCF abduction in the cytoplasm as a cause of aberrant DNA hypermethylation of the human *BRCA1* gene promoter in samples from patients with sporadic breast cancer (Butcher and Rodenhiser, 2007). An alternative comes from DNA methylation of a sub-group of CTCF-binding motifs that possess CpG dinucleotides that, when methylated, cause CTCF dissociation (Recillas-Targa *et al.*, 2006; De La Rosa-Velázquez *et al.*, 2007; Filippova, 2008). Otherwise, it has been postulated that phosphorylation and poly(ADP-ribosylation) are two post-translational CTCF modifications involved in its functions (Yu *et al.*, 2004; El-Kady and Klenova, 2005). In agreement, poly(ADP-ribosylation) of CTCF has been shown to have a role in structural and functional properties at the mouse *p53* locus (Su *et al.*, 2009). More recently, loss of CTCF binding by aberrant poly(ADP-ribosylation) is also responsible for the epigenetic

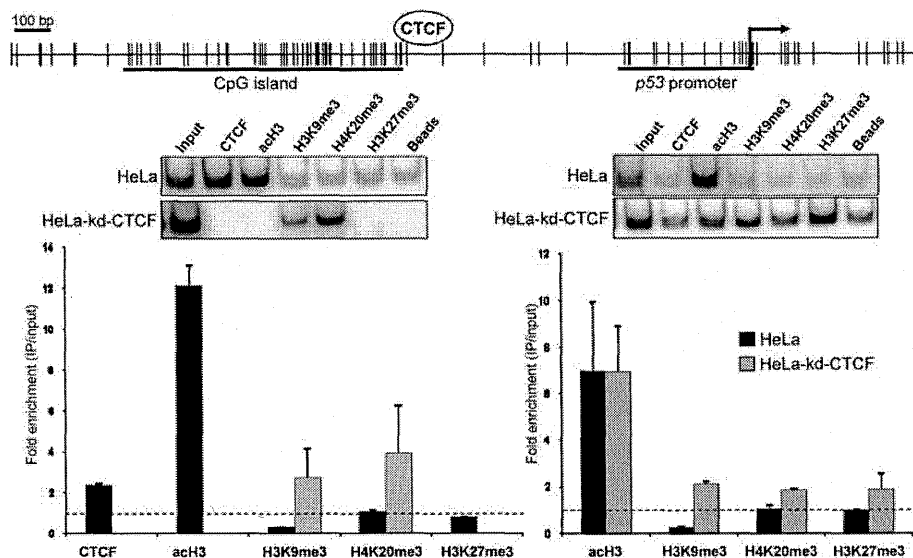


**Figure 5** Effect of a CTCF knockdown on *p53* and *Rb* expression in HeLa cells. (a) A small hairpin RNA that interferes with CTCF production was stably transfected in HeLa cells (HeLa-kd-CTCF) and its effect was evaluated by immunofluorescence and western blot using  $\alpha$ -actin antibody as loading control. (b) HeLa-kd-CTCF causes a severe effect on *p53* gene expression and protein synthesis. (c) To a lesser extent CTCF knockdown causes a reduction in *Rb* gene expression. *GAPDH* primers were used for gene expression normalization. (d) Comparative determination of the relative abundance of *p53* mRNA in different cell lines, including the treatment with the DNA methylation inhibitor (5-aza-2'-deoxycytidine (5-azadC)) and the poly(ADP-ribosyl)-polymerase inhibitor 3-aminobenzamide (3-ABA) at 8 mM for 48 h. In this experiment  $\beta$ -actin gene primers are used for gene expression normalization.

silencing of the *p16<sup>INK4a</sup>* tumor suppressor gene (Witcher and Emerson, 2009). These reports are in agreement with our finding in which *p53* gene expression can be altered when HeLa cells are treated with the

3-aminobenzamide inhibitor and CTCF activity is perturbed (Figure 5d).

On the basis of our previous data and the results in this work, we propose a relationship between the nature



**Figure 6** Epigenetic consequences of the CTCF knockdown on the *p53* promoter region. Comparative chromatin immunoprecipitation assay using antibodies against open and repressive histone marks. HeLa and HeLa knockdown cells for CTCF (HeLa-kd-CTCF) were compared. Horizontal dotted line shows the input value (normalized to 1).

of a CpG island and the mechanism of silencing. For the *retinoblastoma* gene promoter, which corresponds to a high CpG island, DNA methylation is mostly involved in promoter silencing. In contrast, for the *p53* promoter region formed by an intermediate CpG island, DNA methylation is not directly involved but instead H3K9me3, H4K20me3 and H3K27me3 histone modifications are the main (and probably not the only) epigenetic signals for promoter silencing. This can now be interpreted in the context of the recent chromatin structural and functional characterization of the mouse *p53* locus (Su *et al.*, 2009). In this work, the mouse *p53* locus was defined by two domains, in which the first one is shielded by sequences bound *in vivo* by CTCF. This domain is further depleted in histone H1, it adopts a three-dimensional organization and is enriched in open chromatin marks that extend to the promoter region and the first intron (Su *et al.*, 2009). Sequence analysis reveals that the human *p53* genomic organization is similar to that of its mouse homolog, as it contains a second CTCF-binding site in humans (data not shown). We suggest that the genomic organization of the human *p53* locus resembles its mouse homolog, and that the aberrant DNA methylation is incorporated 'outside' of the first domain, that is, upstream and downstream relative to the CTCF-binding sites, and that such distal genomic regions contribute negatively to *p53* expression in glioma cell lines. An alternative interpretation of our reactivation results in glioma cells can come from the indirect effect of DNA methylation over the expression of *p53* regulators or genomic loci directly or indirectly linked to *p53* gene regulation. This is an attractive possibility that can even include antisense RNAs or microRNAs that merits to be explored (Le *et al.*, 2009; Mahmoudi *et al.*, 2009).

Another aspect that deserves to be mentioned is the presence of a newly described *p53* natural antisense

transcript named *Wrap53* (Mahmoudi *et al.*, 2009). One of its isoforms, overlapping the first exon of *p53*, can form *Wrap53/p53* hybrids and such association has been shown to be critical for *p53* normal regulation (Figure 3a). Therefore, at this point we cannot discard that the dual location of CTCF and its potential contribution to sub-domains formation can participate in the symbiotic regulation through transcriptional activation of *p53* and *Wrap53*, and those repressive epigenetic mechanisms may be found 'outside' of this regulatory sub-domain.

An opposing player could be the paralog of CTCF, the brother of the regulator of imprinted sites (BORIS), also known as CTCFL (Klenova *et al.*, 2002; Jelinic *et al.*, 2006). BORIS has been shown to be primarily expressed as a testis-specific gene (Loukinov *et al.*, 2002). BORIS has also shown to be abnormally expressed in a variety of cancers (Hong *et al.*, 2005). In a recent study on the *BAG-1* oncogene promoter, it has been shown that CTCF binding to the *BAG-1* gene promoter increases as the *Dnmt* genes are deleted, whereas BORIS binding increases when *Dnmts* are overexpressed (Sun *et al.*, 2008). This opposing behavior is further reflected by changes in H3K4me2 and H3K9me2 ratio. Thus, we cannot discard the possibility that the hypermethylation of the *Rb* promoter may favor BORIS recruitment and CTCF displacement. In the case of the *p53* gene promoter, BORIS incorporation seems unlikely based on the hypomethylation state of the promoter. Conversely, it has been shown, at least *in vitro*, that BORIS DNA binding can be methylation independent only when CTCF is displaced (Nguyen *et al.*, 2008). Hence, BORIS binding to *p53* regulatory region could also be envisioned, even in absence of DNA methylation, causing its epigenetic miss-regulation. The participation of BORIS in the epigenetic silencing of tumor suppressor genes such as *Rb* and *p53* is a research topic that is currently under investigation.

Finally, we envision a structural role for CTCF in tumor suppressor gene promoters. We do not believe that CTCF is always located at the boundaries of promoter regions (Barski *et al.*, 2007; Irizarry *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2009), and that its intergenic and/or intragenic distribution may also direct an optimal topology of each chromatin domain inside the cell nucleus. Therefore, it is attractive to consider CTCF as having a key role in tumor suppressor gene regulation, through mechanisms of action that probably occur at multiple levels.

## Materials and methods

### Cell culture

All the cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium and RPMI-1640 media containing 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The primary cell culture of fibroblasts was obtained from human neonatal foreskin tissue, and these cells were kindly provided by Luis Alonso Herrera (Instituto Nacional de Cancerología, México, D.F., México), and they were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 15% fetal bovine serum, 1% non-essential amino acids and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen).

### RT-PCR

For RT-PCR analysis, total cellular RNA was isolated with Trizol reagent (Invitrogen). First-strand complementary DNA was synthesized using 1 µg of RNA per reaction with AMV reverse transcriptase and Oligo-dT (Promega, Madison, WI, USA). The primers used for RT-PCR reactions were: For p53: P53RTF2: 5'-GGAAGACTCCAGTGGTAATC-3' and P53RTR2: 5'-TTCAGGTGGCTGGAGTGAG-3'. For human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): GAPDHGF: 5'-GGAGTCCACTGGCGTCTTC-3' and GAPDHR: 5'-GGTTCACCCATGACGAAC-3'. Rb RT-PCR was performed as described (De La Rosa-Velázquez *et al.*, 2007). The GAPDH sequence was used as a normalizing control together with the p53 primers in a radioactive [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP duplex PCR. The products were separated on a 5% polyacrylamide gel electrophoresis and analyzed using Image Quant 5.2 Software. The p53 expression levels were evaluated by six independent experiments.

### Western blotting

Cells were harvested with lysis buffer containing 20 mM HEPES pH 7.9, 400 mM potassium chloride, 20% glycerol, 2 mM dithiothreitol and protease inhibitors, and freeze-thawed twice, and proteins were quantified using the Bradford assay (Bio-Rad, Philadelphia, PA, USA). After separation using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, the resolved proteins were transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (Millipore, Milford, MA, USA). Membranes were blocked with 5% non-fat milk for 2 h and then incubated with the appropriate antibody overnight at 4 °C with anti-p53 (sc-6243) and anti-CTCF (sc-5916) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). After washing, the blots were incubated for 1 h with an appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology), and washed and then detected with a chemiluminescence substrate according to the manufacturer's instructions (Pierce, Rockford, IL, USA).

### ChIP assay

The ChIP assay was performed as previously reported (Valadez-Graham *et al.*, 2004) with 4 µg of antibodies against acH3, acH4 and H3K4me2 antibodies from Upstate (Billerica, MA, USA) and H3K9me3, H3K27me3 and H4K20me3 antibodies kindly provided by Thomas Jenuwein (Max-Planck Institute of Immunobiology, Freiburg, Germany). Immunoprecipitated DNA was analyzed by PCR using primers specific for the human p53 gene promoter. For the semi-quantitative ChIP assay, duplex-PCR was performed as described (Sawado *et al.*, 2001). Primer sequences used for ChIP assays are available by request. For the duplex PCR we used for normalization  $\beta$ -actin for the close histone marks and MyoD for open histone marks (Sawado *et al.*, 2001). For each antibody, at least three independent ChIP experiments were performed.

### Restriction enzyme accessibility assay

For restriction endonuclease *in situ* nuclear digestion we followed the protocol established previously (Escamilla-Del-Arenal and Recillas-Targa, 2008). Data were analyzed using Southern blotting with EcoRI genomic restriction enzyme digestion. Two complementary probes were used (probes 1 and 2).

### Electrophoretic mobility shift assay

The electrophoretic mobility shift assay and nuclear extract preparation were performed as previously described (Schreiber *et al.*, 1989; Valadez-Graham *et al.*, 2004). Competitions were carried out with 200 pmol of gel-purified unlabeled oligonucleotides. The probes used (showing only the top strand) were P53CTCF F: 5'-CCTACGCTCCCCCTACCGAGTCCCCGC GGTAATTCTTAAAGCACCTGCACCGCCCCCGCCG CCTGCAGAGGGCG-3'. FII (CTCF-binding site of the chicken  $\beta$ -globin cHS4 insulator), Rb-CTCF motif and Sp1 primers were used as competitors (De La Rosa-Velázquez *et al.*, 2007).

### DNA methylation analysis

Bisulfite analysis was performed as previously described (Clark *et al.*, 2006); the sequences of the primers used for amplification of the bisulfite-treated promoter are shown in the Supplementary Table 1. A second round of PCR amplification was performed using nested sets of primers (Kang *et al.*, 2001). The DNA from the second PCR was gel purified, and amplification products were cloned in pGEM-T Easy vector (Promega) for sequencing using the T7 primer. A DNA fragment including 16 CpG dinucleotides of the p53 core promoter and neighboring genomic sequences (sites 1–7) were amplified and sequenced in T98G cells and different cell lines (for sites 3 and 4). As controls, DNA from normal human lymphocytes was methylated *in vitro* by SssI methyltransferase, and used as a positive methylated DNA from an Alu repeat and the promoter region of the FZD9 gene (see Supplementary Table 1). Bisulfite genomic-sequencing primers were designed using Methyl Primer Express Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### Stable transfection of small hairpin RNA against CTCF in HeLa cells

HeLa cells were stably transfected using LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) with a small hairpin RNA expression vector targeting CTCF (pCT1) kindly provided by Ko Ishihara (Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University, Japan) (Ishihara *et al.*, 2006). HeLa cells were selected for 3 weeks in the presence of puromycin (1 µg/ml).

### Immunofluorescence assays

The cell lines grown on glass coverslips were fixed for 10 min in 1% formaldehyde in phosphate-buffered saline. Cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 5 min, and successively incubated with 100 mM of glycine. They were then incubated with the appropriate primary and secondary antibodies for 1 h at room temperature. They were next mounted with Ultracruz for fluorescence with 4,6-diamidino-2-phenylindole to visualize the nucleus (Santa Cruz Biotechnology, sc-24941). Primary antibodies used were: anti-CTCF rabbit polyclonal (Valadez-Graham *et al.*, 2004), anti-p53 goat polyclonal, anti-Rb rabbit polyclonal (Santa Cruz Biotechnology) and the histone acH3 (Upstate), H3K9me3, H3K27me3 and H4K20me3 antibodies. Primary antibodies bound to antigens were revealed using fluorescein isothiocyanate, or Texas red secondary antibodies. The slides were analyzed using epifluorescence and optical sectioning in an Apotome microscope (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) and using a laser scanning microscope (Olympus, Center Valley, PA, USA).

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

Amatya VJ, Naumann U, Weller M, Ohgaki H. (2005). TP53 promoter methylation in human gliomas. *Acta Neuropathol* **110**: 178–184.

Antequera F. (2003). Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci* **60**: 1647–1658.

Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schonnes DE, Wang Z *et al.* (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**: 823–837.

Butcher DT, Rodenhiser DI. (2007). Epigenetic inactivation of BRCA1 is associated with aberrant expression of CTCF and DNA methyltransferase (DNMT3B) in some sporadic breast tumours. *Eur J Cancer* **43**: 210–219.

Clark SJ, Statham A, Stirzaker C, Molloy PL, Frommer M. (2006). DNA methylation: bisulphite modification and analysis. *Nat Protocols* **1**: 2353–2364.

De La Rosa-Velázquez IA, Rincón-Arango H, Benítez-Bribiesca L, Recillas-Targa F. (2007). Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. *Cancer Res* **67**: 2577–2585.

Docquier F, Kita GX, Farrar D, Jat P, O'Hare M, Chernukhin I *et al.* (2009). Decreased poly(ADP-ribosylation) of CTCF, a transcription factor, is associated with breast cancer phenotype and cell proliferation. *Clin Cancer Res* **15**: 5762–5771.

El-Kady A, Klenova E. (2005). Regulation of the transcription factor, CTCF, by phosphorylation with protein kinase CK2. *FEBS Lett* **579**: 1424–1434.

Escamilla-Del-Arenal M, Recillas-Targa F. (2008). GATA-1 modulates the chromatin structure and activity of the chicken  $\alpha$ -globin 3' enhancer. *Mol Cell Biol* **28**: 575–586.

Filippova G. (2008). Genetics and epigenetics of the multifunctional protein CTCF. *Curr Top Dev Biol* **80**: 337–360.

Guelen L, Pagie L, Brasset E, Meuleman W, Faza MB, Talhout W *et al.* (2008). Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* **453**: 948–951.

Hong JA, Kang Y, Abdullaev Z, Flanagan PT, Pack SD, Fischette MR *et al.* (2005). Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the NY-ESO-1 promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells. *Cancer Res* **65**: 7763–7774.

### Acknowledgements

We thank Inti Alberto de la Rosa-Velázquez, Catherine Farrell, Mayra Furlan-Magaril, Francisco Antequera, Abraham Hernández-Hernández, Martín Escamilla-del-Arenal and Héctor Rincón-Arango for suggestions and constant scientific discussions. We are particularly indebted with the excellent technical assistance of Georgina Guerrero Avendaño, members of the Félix Recillas-Targa laboratory, Dr JA García-Saiz and the Instituto de Fisiología Celular, UNAM. We thank L Ongay, G Codiz and M Mora from the Unidad de Biología Molecular, IFC-UNAM, for DNA sequencing. This work was supported by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Universidad Nacional Autónoma de México (IN209403 and IN214407), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT: 42653-Q and 58767) and Fundación Miguel Alemán, AC. E Soto-Reyes is supported by a PhD fellowship from CONACyT (181389) and Dirección General de estudios de Posgrado-Universidad Nacional Autónoma de México (DGEP). Additional support was provided by the PhD Graduate Program of Doctorado en Ciencias Biomédicas.

Ishihara K, Oshimura M, Nakao M. (2006). CTCF-dependent chromatin insulator is linked to epigenetic remodeling. *Mol Cell* **23**: 733–742.

Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P *et al.* (2009). The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet* **41**: 178–186.

Issa J-P. (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* **4**: 988–993.

Jelincic P, Stehle JC, Shaw P. (2006). The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation. *PLoS Biol* **4**: e355.

Jones PA, Bayliss SB. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* **128**: 683–692.

Kang JH, Kim SJ, Noh DY, Park IA, Choe KJ, Yoo OJ *et al.* (2001). Methylation in the p53 promoter is a supplementary route to breast carcinogenesis: correlation between CpG methylation in the p53 promoter and the mutation of the p53 gene in the progression from ductal carcinoma in situ to invasive ductal carcinoma. *Lab Invest* **81**: 573–579.

Kim TH, Abdullaev ZK, Smith AD, Ching KA, Loukinov DI, Green RD *et al.* (2007). Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell* **128**: 1231–1245.

Klenova EM, Morse III HC, Ohlsson R, Lobanenko VV. (2002). The novel BORIS+CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin Cancer Biol* **12**: 399–414.

Kondo Y, Shen L, Cheng AS, Ahmed S, Bumber Y, Charo C *et al.* (2008). Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet* **40**: 741–750.

Le MT, Teh C, Shyh-Chang N, Xie H, Zhou B, Korzh V *et al.* (2009). MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev* **23**: 862–876.

Loukinov DI, Pugacheva E, Vatolin S, Pack SD, Moon H, Chernukhin I *et al.* (2002). BORIS, a novel male germ-line protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 6806–6911.

- Mahmoudi S, Henriksson S, Corcoran M, Méndez-Vidal C, Wiman KG, Farnebo M. (2009). Wrap53, a natural p53 antisense transcript required for p53 induction upon DNA damage. *Mol Cell* **33**: 462–471.
- McGarvey KM, Fahrner JA, Greene E, Martens J, Jenuwein T, Baylin SB. (2006). Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. *Cancer Res* **66**: 3541–3549.
- Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A *et al.* (2008). Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* **454**: 766–770.
- Nguyen P, Cui H, Bisht KS, Sun L, Patel K, Lee RS *et al.* (2008). CTCFL/BORIS is a methylation-independent DNA-binding protein that preferentially binds to the paternal H19 differentially methylated region. *Cancer Res* **68**: 5546–5551.
- Pogribny IP, Pogribna M, Christman JK, James SJ. (2000). Single-site methylation within the p53 promoter region reduces gene expression in a reporter gene construct: possible *in vivo* relevance during tumorigenesis. *Cancer Res* **60**: 588–594.
- Recillas-Targa F, De La Rosa-Velázquez IA, Soto-Reyes E, Benítez-Bribiesca L. (2006). Epigenetic boundaries of tumour suppressor gene promoters: the CTCF connection and its role in carcinogenesis. *J Cell Mol Med* **10**: 554–568.
- Sawado T, Igarashi K, Groudine M. (2001). Activation of  $\beta$ -major globin gene transcription is associated with recruitment of NF-E2 to the  $\beta$ -globin LCR and gene promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 10226–10231.
- Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W. (1989). Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini extracts', prepared from a small number of cells. *Nucl Acids Res* **17**: 6419.
- Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G *et al.* (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev* **18**: 1251–1262.
- Su CH, Shann YJ, Hsu MT. (2009). p53 chromatin epigenetic domain organization and p53 transcription. *Mol Cell Biol* **29**: 93–103.
- Sun L, Huang L, Nguyen P, Bisht KS, Bar-Sela G, Ho AS *et al.* (2008). DNA methyltransferase 1 and 3B activate *BAG-1* expression via recruitment of CTCFL/BORIS and modulation of promoter histone methylation. *Cancer Res* **68**: 2726–2735.
- Valadez-Graham V, Razin SV, Recillas-Targa F. (2004). CTCF-dependent enhancer blockers at the upstream region of the chicken  $\alpha$ -globin gene domain. *Nucleic Acids Res* **32**: 1354–1362.
- Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. (2008). The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* **7**: 979–987.
- Vousden KH, Prives C. (2009). Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell* **137**: 413–431.
- Yu W, Ginja V, Pant V, Chernukhin I, Whitehead J, Docquier F *et al.* (2004). Poly(ADP-ribosylation) regulates CTCF-dependent chromatin insulation. *Nat Genet* **36**: 1105–1110.
- Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M *et al.* (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* **39**: 457–466.
- Williams A, Flavell RA. (2008). The role of CTCF in regulating nuclear organization. *J Exp Med* **205**: 747–750.
- Witcher M, Emerson BM. (2009). Epigenetic silencing of the *p16<sup>INK4a</sup>* tumor suppressor is associated with loss of CTCF binding and a chromatin boundary. *Mol Cell* **34**: 271–284.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

# Cyclin D1 Is Transcriptionally Down-Regulated by ZO-2 via an E Box and the Transcription Factor c-Myc

Miriam Huerta,\* Rodrigo Muñoz,\* Rocío Tapia,† Ernesto Soto-Reyes,‡  
Leticia Ramírez,\* Félix Recillas-Targa,‡ Lorenza González-Mariscal,†  
and Esther López-Bayghen\*

Departamentos de \*Genética y Biología Molecular and †Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Cinvestav-Zacatenco, México D.F. 07360, México; and ‡Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México

Submitted February 9, 2007; Revised August 28, 2007; Accepted September 6, 2007  
Monitoring Editor: Asma Nusrat

Recent reports have indicated the participation of tight junction (TJ) proteins in the regulation of gene expression and cell proliferation. Here, we have studied the role of zona occludens (ZO)-2, a TJ peripheral protein, in the regulation of cyclin D1 transcription. We found that ZO-2 down-regulates cyclin D1 transcription in a dose-dependent manner. To understand how ZO-2 represses cyclin D1 promoter activity, we used deletion analyses and found that ZO-2 negatively regulates cyclin D1 transcription via an E box and that it diminishes cell proliferation. Because ZO-2 does not associate directly with DNA, electrophoretic mobility shift assay and chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay were used to identify the transcription factors mediating the ZO-2-repressive effect. c-Myc was found to bind the E box present in the cyclin D1 promoter, and the overexpression of c-Myc augmented the inhibition generated by ZO-2 transfection. The presence of ZO-2 and c-Myc in the same complex was further demonstrated by immunoprecipitation. ChIP and reporter gene assays using histone deacetylases (HDACs) inhibitors demonstrated that HDACs are necessary for ZO-2 repression and that HDAC1 is recruited to the E box. We conclude that ZO-2 down-regulates cyclin D1 transcription by interacting with the c-Myc/E box element and by recruiting HDAC1.

## INTRODUCTION

Zona occludens (ZO)-2 is a peripheral tight junction (TJ) protein that belongs to the membrane associated guanylate kinases (MAGUK) protein family. ZO-2, and the other epithelial cell ZO proteins named ZO-1 and ZO-3, possess the basic MAGUK core of Src homology (SH)3 and GuK domains, and they harbor three postsynaptic density 95/disc-large/zona occludens (PDZ) repeats. These proteins additionally present a carboxy-terminal region, which in the case of ZO-1 and ZO-2 contains a proline-rich module (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2000). The subcellular localization of ZO-2 is strongly sensitive to the state of cell–cell contacts displayed by the monolayer. Thus, in confluent monolayers ZO-2 is concentrated at the TJ, whereas in sparse cultures it is enriched at the nucleus and cell–cell contacts. Shuttling between the nucleus and the plasma membrane is possible due to the presence of several functional nuclear localization and exportation signals in the sequence of the protein (Jaramillo *et al.*, 2004; Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2006).

ZO-2 associates with the nuclear matrix (Jaramillo *et al.*, 2004), and it displays a speckled nuclear distribution that partially colocalizes with that of the pre-mRNA splicing protein SC-35 (Islas *et al.*, 2002). ZO-2 interacts with scaffold attachment factor B, a chromatin component involved in the

assembly of transcriptosome complexes (Traweger *et al.*, 2002), and with the transcription factors Jun, Fos, and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP). ZO-2 has further been shown to inhibit the transcription of a reporter gene with a promoter under the control of activator protein (AP)-1 sites (Betanzos *et al.*, 2004).

The canonical role of TJs is to act as a gate that regulates the passage of ions and molecules through the paracellular pathway and to function as a fence that maintains the polarized distribution of lipids and proteins in the plasma membrane. However, in recent years, the role of TJs as regulators of cell proliferation and differentiation has started to emerge. For example, ZO-1, another MAGUK protein of the TJ, has been found to associate through its SH3 domain to ZONAB, a Y-box transcription factor that stimulates cell proliferation (Balda and Matter, 2000; Balda *et al.*, 2003; Sourisseau *et al.*, 2006).

Several studies suggest that ZO-2 functions as a tumor suppressor in epithelial cells. First, ZO proteins are homologous to the product of the lethal disc large-1 tumor suppressor gene of *Drosophila* (Willott *et al.*, 1993). Second, ZO-2 expression is down-regulated in breast and pancreas human carcinomas (Chlenski *et al.*, 1999, 2000), and third, the overexpression of ZO-2 suppresses transformation by the oncogenic determinants E4 from adenovirus type 9, Ras V12, and the polyomavirus middle T protein (Glaunsinger *et al.*, 2001).

In this study, we have further pursued the participation of ZO-2 in gene transcription, and due to the emerging role of TJ proteins in cell proliferation, we have analyzed the impact of ZO-2 on the transcription of cyclin D1. Cyclin D assembles with CDK4/6 in early G1. Accumulation of this complex leads to the activation of the kinases that phosphorylate

This article was published online ahead of print in *MBC in Press* (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E07-02-0109>) on September 19, 2007.

Address correspondence to: Esther López-Bayghen (ebayghen@cinvestav.mx).

and inactivate the tumor suppressor retinoblastoma, a necessary step for cell cycle progression through G1-to-S phases (Harbour and Dean, 2000). The expression levels of cyclin D1 have been shown to be rate limiting in cellular proliferation induced by a variety of stimuli (Ohtsubo and Roberts, 1993; Quelle *et al.*, 1993; Albanese *et al.*, 1995; Watanabe *et al.*, 1996), and an increased expression of cyclin D1 has been observed in several tumors (Wang *et al.*, 1994; Arber *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997; Albanese *et al.*, 1999).

Here, we have analyzed cyclin D1 promoter activity under the influence of ZO-2. We observed that ZO-2 represses cyclin D1 transcription in a manner that is dependent on a region localized between nucleotides -694 to -550 in the promoter, which harbors a typical E box. c-Myc and HDAC1 bind to this E box and in a complex with ZO-2 inhibit cyclin D1 transcription, resulting in a diminished cell proliferation rate. Together, these data support the idea of ZO-2 as a participant in the transcriptional control of cyclin D1, a key cell cycle regulator.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell Culture

Epithelial Madin Darby canine kidney (MDCK) cultures (MDCK, CCL34) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). Cells between the 60th and 90th passage were grown at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere with DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) containing 10% fetal bovine serum, 50 µg/ml gentamicin, and 100 IU/ml penicillin. Cells were harvested with trypsin-EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA) and plated on multiwell plates for further assays, seeding 2.5 × 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>.

### Plasmids

Full-length ZO-2 introduced into the cytomegalovirus (CMV) expression plasmid pGW1 (pGW1-HA-ZO-2) was kindly provided by Dr. Ronald Javier (Baylor College of Medicine, Houston, TX). pCB6-ZO-1myc was kindly provided by Dr. Maria Susana Balda (Institute of Ophthalmology, University College of London, London, United Kingdom). pHMyc3E plasmid contains the human c-Myc cDNA, exons 1-3 (Jones and Cole, 1987), modified in an LTR/pBR322 plasmid (denoted only as pBR322), and it was a kind gift of Dr. Patricio Gariglio (Cinvestav, Mexico). The luciferase reporter gene under the control of the human cyclin D1 promoter (Herber *et al.*, 1994) (pXP2-CD1) and its mutated versions at 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)-response element (TRE/AP-1) (pXP2-CD1mTRE) and CRE sites (pXP2-CD1mCRE), and the pRSV-β-Gal plasmid with a Rous sarcoma virus promoter and β-galactosidase reporter (Thierry *et al.*, 1992), were kind gifts of Dr. Francoise Thierry (Institute Pasteur, Paris, France). pXP2-CD1 was also used to generate three deletion constructs that eliminate the E2F site by using the following pairs of restriction enzymes: BstXI and BlnI (p-694ΔCycD1), MscI and PmlI (p-550ΔCycD1), and BstXI and DsaI (p-492ΔCycD1) (see map in Figure 4B). For SoxCAT construction, the double-stranded Sox10 oligonucleotide from Myelin Basic Protein Gene Promoter (Wei *et al.*, 2004) was cloned upstream of the simian virus 40 promoter (pCAT-promoter vector; Promega, Madison, WI). All plasmids were purified using the QIAGEN plasmid purification kit (QIAGEN, Valencia, CA), verified by restriction and complete automated sequence analyses.

### Transient Transfections and Reporter Assays

Transient transfections were performed in sparse MDCK cultures by using Lipofectamine Plus (Invitrogen) or Lipofectamine 2000 (Invitrogen) protocol, under the manufacturer's conditions. Amounts used of each reporter plasmid and expression vector are indicated in each figure. Cells were incubated with the mixture for 3 h. After that, cells were incubated for a further 48 h with fresh medium to allow recovery. They were subsequently harvested and processed for reporter measurement. Luciferase assays were performed with the Luciferase assay system (Promega). Briefly, protein lysates were obtained as follows. Cells were harvested in cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed with two freeze-thawing cycles and resuspended in 100 µl of reporter lysis buffer. Equal amounts of protein lysates (~70 µg) were incubated with luciferase assay reagent. Light detection was performed in a FluoroSkan Ascent FL 374 (Thermo Electron, Waltham, MA). For chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assays, normalized protein lysates (in lysis buffer, up to ~80 µg) were incubated with 0.25 µCi of [<sup>14</sup>C]chloramphenicol (50 mCi/mmol; GE Healthcare, Chalfont St. Giles, United Kingdom) and 0.8 mmol/l acetyl-CoA (Sigma-Aldrich) at 37°C. Acetylated forms were separated by thin layer chromatography and quantified using a Typhoon optical scanner (GE Healthcare). CAT activities were expressed as the acetylated fraction cor-

rected for the activity recorded from empty-vector-transfected control. For β-galactosidase assays, normalized amounts of protein lysates were used to determine β-galactosidase activity by using 200 µl of O-nitrophenyl β-D-galactopyranoside solution (4 mg/ml; Sigma-Aldrich) as substrate in 500 µl of Z-buffer (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, and 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0). After incubation for 16 h at 37°C, the reaction was stopped by adding 200 µl of 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, and the absorbance of the reaction product was read at 410 nm using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate reader (Opsys MR; Dynex Technologies, Chantilly, VA).

For chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays, MDCK cells were electroporated with pGW1-derived plasmids. For this purpose, cells were harvested and washed in PBS by low-speed centrifugation. Cells (1 × 10<sup>7</sup>) were suspended in 400 µl of basal DMEM medium containing 20 µg of pGW1-HA-ZO-2 plasmid. Electroporation was carried out at room temperature using single voltage pulse (250 mV; 960 µF) with a Gene-Pulser electroporator (Bio-Rad, Hercules, CA). Cells were then plated into 15-cm cell culture dishes. Two days later, cells were collected for the ChIP assay.

### Cell Proliferation Assays

DNA synthesis was assessed using [<sup>3</sup>H]thymidine; cells were seeded in six-well plates, transfected with indicated vectors, and incubated for 12–96 h with 1 µCi/ml [<sup>3</sup>H]thymidine. The incorporation was stopped with cold PBS, precipitation with 5% trichloroacetic acid, and cell lysis with 0.4 M NaOH. After 1 h of gentle agitation at room temperature, 15 µl of each sample were taken for protein quantification, and the rest was solubilized in 25 µl of 10% acetic acid and 2 ml of scintillation liquid. Samples were counted in a beta-scintillation counter (LS6000SC, Beckman Coulter, Fullerton, CA).

For 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma-Aldrich) MTT reduction assay (Mosmann, 1983), cells were seeded on 12-well plates in 500 µl of culture media and incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. They were analyzed in quadruplicates at 48 h. Then, 40 µl of MTT labeling mixture was added to each well, and the samples were incubated 4 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. An isopropanol:HCl solution was added to lyse the cells and to solubilize the colored crystals. The optical density of the samples was determined at 630 nm using an ELISA plate reader Opsys MR (Dynex Technologies).

### Wound Healing Assay

For wound healing assays, MDCK cells (4 × 10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup>) were seeded in eight-well glass slide chambers (Nalge Nunc International, Rochester, NY). After 3 h, cells were transfected with the pGW1 or pGW1-HA-ZO-2 plasmids (5 µg/individual chamber), or they were transfected with small interfering RNAs (siRNAs) (negative control [NC] or siRNA ZO-2; 10 nM). Then, cells were incubated for 48 h to reach confluence. Wounds were introduced to the MDCK-transfected confluent monolayers with a yellow pipette tip to create a cleared line. Monolayers were washed twice with PBS to remove detached cells, and they were incubated with complete media. The wound closure process was photographed, focusing always in the same region every 3 h after wounding (12 h total) and by using an Olympus IX250 microscope (Olympus, Melville, NY). The number of pixels in the denuded area for at least four independent chambers was calculated using the Adobe Photoshop software (Adobe Systems, San Jose, CA).

### ChIP Assays

Sparse MDCK cells were transiently transfected with 20 µg of pGW1-HA-ZO-2. Forty-eight hours posttransfection, cells were treated with 1% formaldehyde for 20 min to cross-link protein-DNA and protein-protein complexes. Chromatin was broken by sonication. The chromatin fragments were immunoprecipitated with 4 µg of the following antibodies: ZO-2 (catalog no. 71-1400; Zymed Laboratories, South San Francisco, CA), hemagglutinin (HA) (catalog no. 7500; Zymed Laboratories), H3Ac (catalog no. 07-353; Upstate Biotechnology), H3 (catalog no. 06-755; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), HDAC1 (catalog no. sc-7872; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and c-Myc (catalog no. sc-7881 Santa Cruz Biotechnology). Preimmune serum and no antibody were used as negative controls. Immunoprecipitates were washed with several buffers and treated with RNase for 1 h, incubated overnight at 65°C to remove cross-linking, and then treated with proteinase K for 2 h. DNA was purified by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation. DNA samples were analyzed by radioactive polymerase chain reactions (PCRs) by using the following pairs of primers: 1) a pair that amplified the E box region present in the cyclin D1 promoter (ChIPeBoxD1S 5'-CGAGCGCATGCTAGGCTGAA-3' and ChIPeBoxD1AS 5'-CTCCGGCTC-CATCTTTCA-3'); 2) a second set of primers that amplified the TRE site present in the cyclin D1 promoter (ChIPAP-ID1S 5'-AACAAACCAATTA-AAAAGCTT-3' and ChIPAP-ID1AS 5'-ATTTCCTTCATCCTGTCTC-3'); and 3) a third pair of oligonucleotides that amplified part of the first exon of cyclin D1 gene and which were used as a negative control (dogD1S 5'-CTGGC-CATGAACACTCTGGA-3' and CNS 5'-CCAGCAGTTCCTGGCCG-3'). PCR reactions were performed at annealing temperature of 59°C for 30 cycles. The products were analyzed in 5% polyacrylamide gels and visualized in a Typhoon optical scanner (GE Healthcare) or exposed to an autoradiographic film.



### Transfection of siRNA

To obtain an effective and highly specific knockdown of ZO-2, we used a Stealth RNA interference (Invitrogen) that was previously shown by us to effectively silence ZO-2 expression (Hernandez *et al.*, 2007). The target sequence for dog ZO-2 siRNA was 5'-CCGACUAUGAAUUAUCAUUCUCAA-3'.

ZO-2 siRNA (10 nM) was transfected into MDCK cells by using Lipofectamine 2000. For reporter assays, the siRNA transfection was performed 24 h before the transfection of the pXP2-CD1 promoter, and the cells were harvested 48 h after the second transfection. For reverse transcription (RT)-PCR, immunodetection and wound healing assays, the transfection was realized as described above, and cultures were harvested 72 h after transfection (Hernandez *et al.*, 2007). RNA extraction and RT-PCR were performed as described below.

### Electrophoretic Mobility Shift Assays

Nuclear extracts were prepared as described previously (Lopez-Bayghen *et al.*, 1996). All buffers contained a protease inhibitors cocktail to prevent nuclear factor proteolysis. Protein concentration was measured by the Bradford method (Bradford, 1976). Nuclear extracts (~10 µg) from sparse MDCK cultures were incubated on ice with 500 ng of poly[dI-dC] as nonspecific competitor (GE Healthcare) and 2 ng of the following <sup>32</sup>P-end-labeled double-stranded oligonucleotides: E box/E2F, 5'-CTAGCAATTTACACGTGTTA-ATGA-3' and c-Myc, 5'-CTAGGAAGCAGACCACGGTCTGCTTCC-3'.

The reaction mixtures were incubated for 20 min on ice, electrophoresed in 7.8% polyacrylamide gels by using a low ionic strength 0.5× Tris borate-EDTA buffer. The gels were then dried and exposed to an autoradiographic film. For competitive analysis, the reactions mixtures were incubated before the addition of labeled DNA, with 100 ng of the following unlabeled competitor oligonucleotides: mMyc, 5'-GGAAGCAGACCACGGTCTGCTTCC-3'; E2F, 5'-CTAGATTTAAGTTTCGCCCTTCTCAA-3'; mE2F, 5'-ATTTAAGTTTCGATCCCTTCTCAA-3'; and AP-1, 5'-CTAGTTCGGCTGAGTC-ATCAAGC-3'.

### RT-PCR

Total RNA was isolated from MDCK cells transiently transfected with different amounts of pGW1-HA-ZO-2 or the empty vector (pGW1). Total RNA was extracted from cells using the TRIzol method (Invitrogen). One microgram of total RNA was used in each analysis. RT-PCR reactions were performed using the Enhanced Avian HS RT-PCR kit (Sigma-Aldrich). The reverse-transcription step was performed at 42°C for 50 min. Amplification conditions for both cyclin D1 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were as follows: after an initial 94°C incubation cycle for 3 min, reactions were amplified for 35 cycles at 94°C for 1 min, 55°C for 2 min, and 72°C for 3 min. The reactions were then incubated at 72°C for 10 min. PCR amplification products were separated on a 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Primers used to amplify the cyclin D1 gene were the following: dogD1S, 5'-CTGCCATGAACCTACCTGGA-3' and dogD1AS, 5'-GGAAGTGCCTCGATGAAGTCG-3'. As control, we used the following specific primers to the GAPDH gene (Hsu *et al.*, 1993): primer 1, 5'-CATCTCTGCCCTCTGCTGA-3' and primer 2, 5'-GGATGACCTTGCCACAGCCT-3'.

Data were quantified by scanning the bands and the optical densities of cyclin D1 were normalized to the GAPDH signal. Data shown are representative of at least three independent experiments.

### Protein Blotting

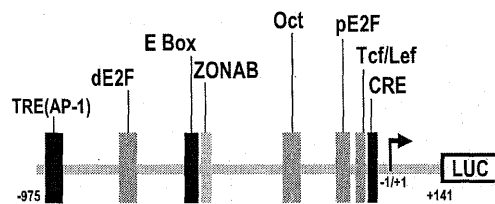
Total extracts from MDCK cells that overexpress ZO-2 or c-Myc, and nuclear extracts from sparse MDCK monolayers (initial seeding  $2.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred into polyvinylidene difluoride membranes (GE Healthcare). Proteins were identified with polyclonal antibodies against ZO-2 (Zymed Laboratories; dilution 1:1000), cyclin D1 (catalog no. sc-717; Santa Cruz Biotechnology; dilution 1:1000), c-Myc (Santa Cruz Biotechnology; dilution 1:1000), HDAC1 (Santa Cruz Biotechnology; dilution 1:1000), and anti-actin (a kind gift of Dr. José Manuel Hernández, Cinvestav, Mexico; dilution 1:50). Peroxidase-conjugated goat immunoglobulin (IgG) against rabbit IgG or against mouse IgG (catalog no. 62-6120 and 62-6520, respectively, Zymed Laboratories; dilution 1:3000) were used as secondary antibodies, followed by a chemiluminescence detection system ECL+ Plus (GE Healthcare).

### Treatments for HDAC Inhibition

For evaluating HDAC activity, cells transfected with pXP2-CD1 and pGW1-ZO-2 were treated with the HDAC inhibitors trichostatin A (TSA; 2 nM) and sodium butyrate (NaB; 5 mM) for 12 h before harvesting.

### Immunoprecipitation

Nuclear extracts from MDCK cells that overexpressed ZO-2 were homogenized in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer. The cell debris of both preparations was removed by centrifugation at 13,000 rpm for 5 min. Then, 500 µg of protein was used for each immunoprecipitation, with 1 µg of



**Figure 1.** Schematic representation of the human cyclin D1 promoter. The pXP2-CD1 reporter vector contains the cyclin D1 regulatory region here shown. TRE(AP-1), TRE, -924 to -938 (Herber *et al.*, 1994); dE2F, distal E2F, -730 to -737 (Herber *et al.*, 1994); E box, bHLH, and Zn finger transcription factors binding site, -547 to -553 (Herber *et al.*, 1994); ZONAB, ZONAB binding site and inverted CCAAT box, -527 to -532 (Sourisseau *et al.*, 2006); Oct, Oct binding site, -646 to -652 (Cicatiello *et al.*, 2004); pE2F, proximal E2F, -133 to -143 (Watanabe *et al.*, 1998); Tcf/Lef, Tcf/Lef binding site, -67 to -77 (Shtutman *et al.*, 1999); CRE, -46 to -53, (Herber *et al.*, 1994); and Start, site of transcription initiation, -1/+1 (Herber *et al.*, 1994). Broken arrow stands for the transcription start point.

the antibody against ZO-2 (catalog no. 37-4700, Zymed Laboratories). The cell lysates were preabsorbed with protein A coupled to agarose for 25 min at 4°C. Agarose-coupled antibodies were incubated overnight at 4°C with protein samples. Agarose beads were washed three times with RIPA buffer. The immunoprecipitates were analyzed by immunoblotting as described above.

## RESULTS

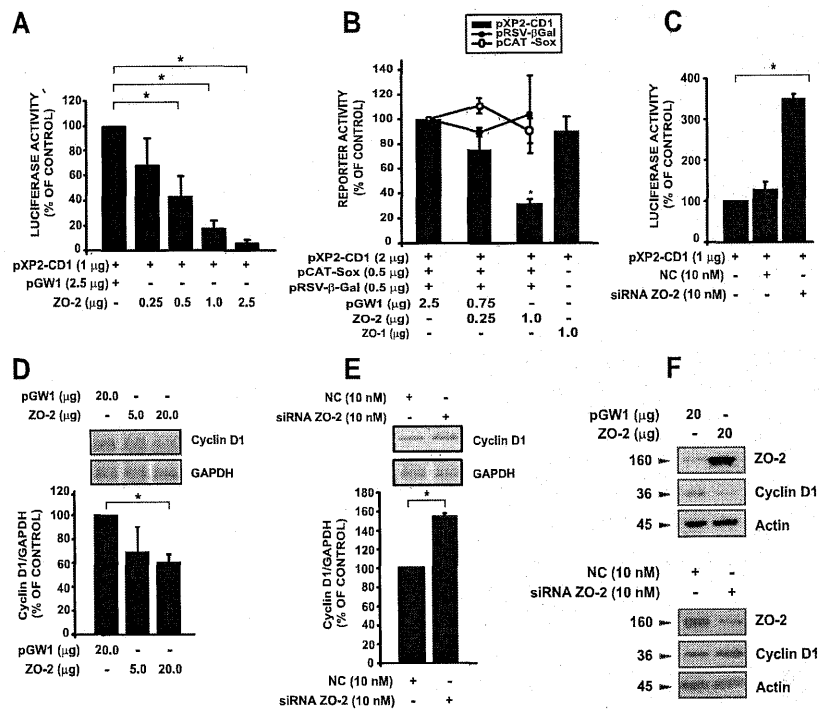
### ZO-2 Down-regulates Cyclin D1 Transcription and Protein Levels

To investigate whether ZO-2 could modulate the transcription of the cyclin D1 gene, we performed reporter gene assays. For this purpose, MDCK cells were transfected with the pXP2-CD1 construct containing the human cyclin D1 regulatory region (Figure 1) driving the transcription of a luciferase reporter gene and transfected with increasing amounts of a vector expressing canine ZO-2 protein (pGW1-HA-ZO-2). Figure 2A illustrates how ZO-2 negatively affects the transcriptional activity of cyclin D1 promoter. ZO-2 specificity was tested in two ways: 1) by cotransfecting along with the pXP2-CD1 and ZO-2 plasmids a different promoter/reporter construct, pRSV-β-Gal or pSoxCAT (Figure 2B shows no significant changes in CAT or β-galactosidase reporter activity) and 2) by overexpressing ZO-1, a related member of the MAGUK family, and a member that shares with ZO-2 several structural characteristics (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2000; Gonzalez-Mariscal *et al.*, 2003) (ZO-1 overexpression did not alter promoter activity; Figure 2B).

To gain additional evidence of the occurrence of this phenomenon, we performed the same experiment with cells where endogenous ZO-2 had been silenced with siRNA. The ZO-2 siRNA decreased ZO-2 protein expression in MDCK cells by 65%, and this effect was apparent within 24 h and persisted for 1 week [(data not shown) (Hernandez *et al.*, 2007)]. Figure 2C shows how ZO-2-silenced cells allowed the cyclin D1 promoter to drive a higher transcription of the luciferase reporter gene than those transfected with an NC siRNA, which was not homologous to anything in the vertebrate transcriptome.

Concomitantly, we tested by semiquantitative RT-PCR the endogenous levels of cyclin D1 messenger to confirm that ZO-2 regulates cyclin D1 transcription. Figure 2D shows the clear reduction of cyclin D1 messenger when ZO-2 was overexpressed, whereas Figure 2E reveals how in ZO-2 knockdown cultures, there was an increase in cyclin D1 mRNA. In MDCK cells, the overexpression of ZO-2 protein

**Figure 2.** ZO-2 down-regulates cyclin D1 transcription. (A) Cyclin D1 promoter activity was tested under conditions of high ZO-2 levels. MDCK cells were transiently cotransfected with 1  $\mu$ g of pXP2-CD1 reporter plasmid and the indicated amounts of pGW1-HA-ZO-2 (ZO-2) expression vector or with the empty vector (pGW1). pXP2-CD1/pGW1 is taken as control. (B) To test the specificity of the ZO-2 effect, MDCK sparse monolayers were cotransfected with different reporter plasmids (pRSV- $\beta$ -Gal, pCAT-Sox, or pXP2-CD1) and ZO-2 or pCB6 ZO-1myc (ZO-1) as indicated in the graph. Control reference activity was taken for each reporter as the activity under the influence of pGW1. (C) Cells were transiently transfected with 10 nM siRNA designed to target ZO-2 mRNA or a NC siRNA not homologous to anything in the vertebrate transcriptome. Forty-eight hours after initial transfection cells were retransfected with 1  $\mu$ g of pXP2-CD1 reporter plasmid. Harvesting was performed after 72 h (total time). Graphs show relative luciferase activity taken as a percentage of control (only pXP2-CD1) activity. (D and E) In vivo transcription of cyclin D1 tested in response to differential expression of ZO-2. Total RNA was extracted from monolayers transiently transfected with full-length ZO-2 (pGW1-HA-ZO-2), the empty vector (pGW1; D), or transfected with siRNA for ZO-2 or NC (E). Semiquantitative RT-PCR assays were performed to detect cyclin D1 mRNA levels. Data were quantified by densitometry of amplified bands normalizing optical densities of cyclin D1 to those from the GAPDH signal. Data shown are relative to control cells transfected only with the empty vector. (F) Cyclin D1 protein levels in MDCK cells, transfected as indicated in D and E, were monitored by Western blotting. Total protein extracts from sparse MDCK cells, transiently transfected with full-length ZO-2 or the empty vector, were analyzed by immunodetection with specific antibodies against ZO-2, cyclin D1, and actin 48 h after transfection. Numbers to the left indicate the molecular sizes in kilodaltons. Data are the mean values  $\pm$  SE of at least three independent experiments; \* $p$  < 0.05, Student's *t* test.



also induced a diminished level of cyclin D1 protein, and opposite to this effect, siRNA of ZO-2 increased cyclin D1 protein expression (Figure 2F). Together, these data indicated that ZO-2 exerts a negative regulation of cyclin D1 transcription.

We next wondered whether changes observed in cyclin D1 reporter gene, mRNA and protein expression could have a physiological relevance on cell proliferation. To pursue this point, DNA synthesis by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation was determined in cells transfected with pGW1-HA-ZO-2 or the empty vector (Figure 3). In cells overexpressing ZO-2, a diminished cell proliferation rate was observed. Differences in cell proliferation rate were significant for those rates obtained between 24 and 96 h.

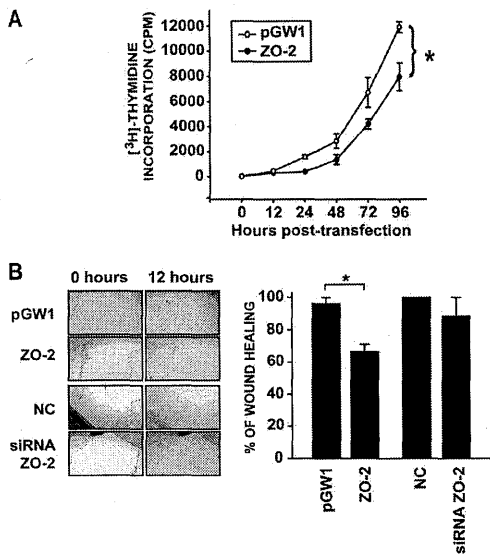
Next, we tested whether the overexpression of ZO-2 as well as the silencing of ZO-2 would affect wound closure. For this purpose, sparse MDCK cells seeded on eight-well glass slide chambers were transfected with pGW1-HA-ZO-2, the empty vector or the siRNAs for ZO-2, or the NC siRNAs unable to silence any mammalian RNA. Once these monolayers reached confluence, a wound was made with a pipette tip, and photographs of the wounded area were taken periodically. Figure 3B illustrates how the culture transfected with ZO-2 exhibited by the 12th hour a delayed healing in comparison with those transfected with the empty vector or the siRNAs. Previously, it had been shown that ZO-2 silencing exerted no effect in cell proliferation (Hernandez *et al.*, 2007); therefore, it is not surprising that ZO-2 silencing does not alter wound healing.

#### ZO-2 Repression Is Mediated by a Putative E2F/E Box Located in the Distal Portion of the Cyclin D1 Promoter

Next, we proceeded to search for elements in the promoter region of cyclin D1 that could mediate the effect induced by ZO-2. Multiple transcription factors have been shown to recognize and regulate cyclin D1 gene activity (Coqueret, 2002). However, we started our study with the AP-1 binding sites TRE(AP-1) and cAMP response element (CRE), because AP-1 is an important activator of cyclin D1 transcription, and also because our previous studies had revealed the interaction of ZO-2 with Jun and Fos (AP-1 complex) and we had demonstrated inhibition of the transcriptional activity of an AP-1-dependent promoter upon ZO-2 overexpression (Betanzos *et al.*, 2004).

Constructs with point mutations in TRE(AP-1) and CRE sites, depicted on the left side of Figure 4A, were tested under ZO-2 influence. As reported previously (Herber *et al.*, 1994), the activity of these mutated constructs is lower than that of the wild-type promoter pXP2-CD1, indicating that indeed, activator elements were removed. With both TRE(AP-1) and CRE mutant plasmids, ZO-2 still had a negative effect over the reporter activity (Figure 4A). This result may be due to the fact that each mutant keeps one AP-1 binding site intact or could arise if ZO-2 exerts its effect by interacting with other transcription factors that bind to sites in the promoter different from TRE(AP-1) and CRE.

Inside the region located between nucleotides (nt) -737/-730 (distal) or between nt -143/-133 (proximal), there are elements recognized by the transcription factors of the E2F



**Figure 3.** Overexpression of ZO-2 modifies cell proliferation rates. (A) DNA synthesis was monitored by [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation into MDCK cells transfected with the ZO-2 expression vector (pGW1-HA-ZO-2) or the empty vector (pGW1). [<sup>3</sup>H]Thymidine uptake was determined at various posttransfection time points. Data shown are mean  $\pm$  SE values of at least three independent experiments performed in triplicate. Differences are significant beginning at 24 h. (B) Wound healing assays were performed on confluent MDCK monolayers previously transfected with 5  $\mu$ g of HA-pGW1-ZO-2 or the empty vector pGW1 or with 10 nM siRNA specific for ZO-2 or the NC. Wound closure was followed by taking microscopic images at different time points after monolayer damage was inflicted. In each case, denuded areas were evaluated, quantified, and compared with obtain the percentage of wound healing (see graph). Data obtained at wound time 0 were set as control. \* $p < 0.05$ , Student's *t* test.

family (Fukami-Kobayashi and Mitsui, 1998; Watanabe *et al.*, 1998; Cicatiello *et al.*, 2004). Because ChIP assays (Cicatiello *et al.*, 2004) have revealed that E2F factors bind to DNA in a cell cycle progression-related manner, we next performed deletions of the E2F region, and we designed functional assays to test the particular relevance of these transcription factors in controlling the cyclin D1 promoter activity under ZO-2 effect.

In accordance with the results found in other cell lines (Watanabe *et al.*, 1998), the deleted distal "E2F" region seemed to contain a silencer element for the cyclin D1 promoter (Figure 4B). The generation of different constructs where the region surrounding E2F was deleted allowed the detection of a fragment located between nt  $-694$  and  $-550$  that is required for attaining the negative response triggered by ZO-2 (Figure 4B). In silico analysis of this region (Figure 4C) revealed the presence of an E box element that was described previously but not tested (Herber *et al.*, 1994; Peukert *et al.*, 1997) and of a novel putative E2F binding site. These observations suggested that ZO-2 may need an intact E box/E2F element located between nt 553 and  $-548$  to exercise its negative effect over cyclin D1 transcription.

#### ZO-2 Associates and Binds In Vivo to the E Box/E2F Element in the Cyclin D1 Promoter Region

To study whether ZO-2 could associate in vivo to the TRE(AP-1) and E box/E2F elements, we performed ChIP

assays amplifying the regions indicated in Figure 5A in either sparse cultures, where ZO-2 is concentrated at the nuclei (Islas *et al.*, 2002) (Figure 5B), or in cells overexpressing ZO-2 (Figure 5C). This assay included immunoprecipitations with anti-histone 3 and acetylated histone 3 antibodies for positive controls, and immunoprecipitations with preimmune serum and without antibody as negative controls. We found that endogenous ZO-2 associates specifically to the E box element but not to the TRE(AP-1) region or the exon 1 segment of the cyclin D1 gene, which was chosen as a negative control. In a similar way, exogenous overexpressed ZO-2 associated to the E box region, demonstrating that ZO-2 binds the canine E box sequence in cyclin D1 promoter in vivo (Figure 5, B and C).

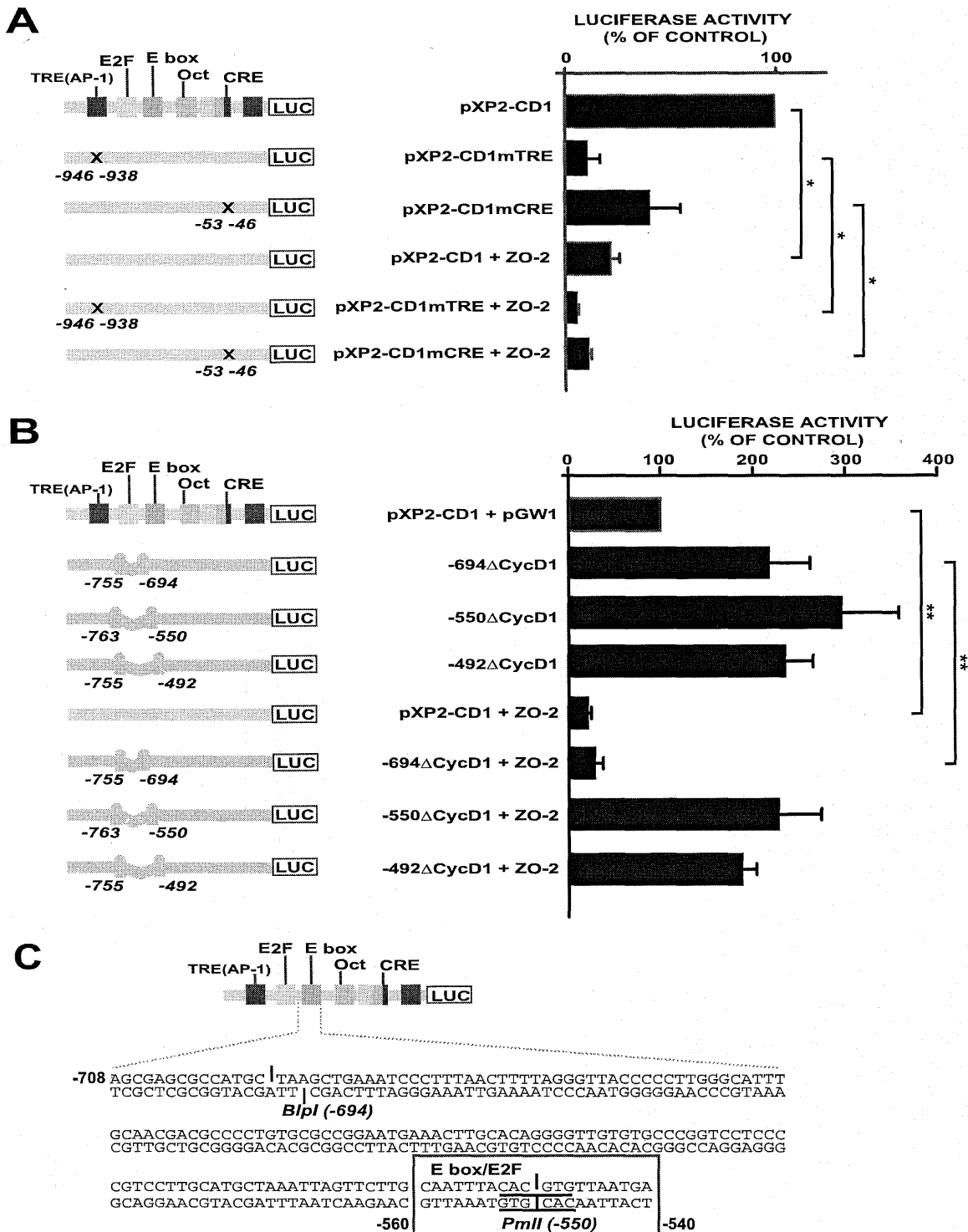
These data support the idea of a physical interaction of ZO-2 with the chromatin region of the cyclin D1 promoter. Because ZO-2 does not have any DNA binding domain inside its structure, we postulated that its negative transcriptional activity might be mediated through other proteins, such as transcription factors that directly recognize DNA elements.

#### c-Myc Recognizes the E box/E2F Region in Cyclin D1 Promoter

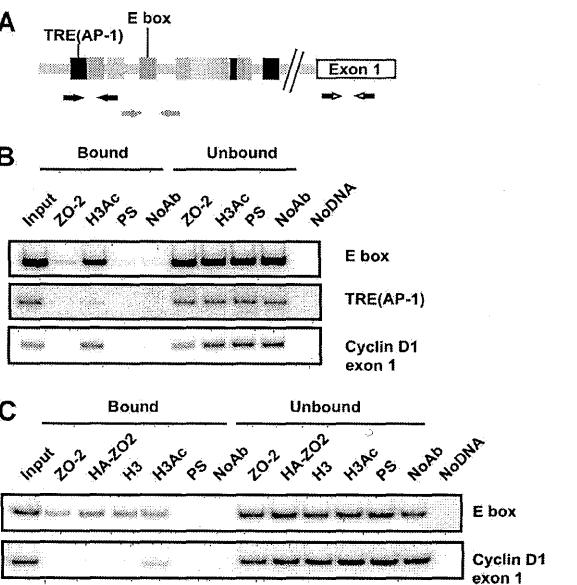
The presence of the above-mentioned E box in the promoter of cyclin D1 was reported previously; yet, the importance of it as a functional element for cyclin D1 regulation had not been explored (Herber *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 2002). Transcription factors binding to E box elements include c-Myc, USF, and Snail (Blackwell *et al.*, 1990; Nieto, 2002; Adhikary and Eilers, 2005; Corre and Galibert, 2005, 2006; De Craene *et al.*, 2005). c-Myc forms heterodimers with Max, and both activate and repress large groups of mammalian genes by recruiting histone modifying and chromatin remodeling enzymes (for review, see Adhikary and Eilers, 2005). In fact, cyclin D1 has been found to be regulated by c-Myc in both an activating and an inhibitory manner (Adhikary and Eilers, 2005; Kleine-Kohlbrecher *et al.*, 2006).

Here, we wondered whether c-Myc could bind to the E box region of the cyclin D1 promoter and whether this factor could allow ZO-2 docking. Thus, EMSAs were performed to identify the nature of the DNA-protein interactions occurring in this particular region. For this purpose, the association between an E box/E2F probe and nuclear proteins extracted from MDCK cells was tested, and the formation of two complexes (Cx1 and Cx2) was found (Figure 6A, left). The appearance of Cx2 was abolished by an excess of non-labeled E2F consensus oligonucleotide. In Figure 6A, middle, it is possible to appreciate that the formation of Cx1 is dependent on c-Myc, because only the c-Myc consensus sequence can effectively compete for it, whereas a heterologous probe, AP-1, or the mutant c-Myc did not cause any effect. Figure 6A, right, shows a reverse competition assay that confirms binding of c-Myc to the E box/E2F region of cyclin D1 promoter.

To determine whether c-Myc localizes in vivo to this E box region present in the distal promoter of cyclin D1, we next performed ChIP assays. First, we demonstrated by Western blot that the c-Myc antibody used recognizes endogenous c-Myc present in nuclear extracts derived from MDCK cells (Figure 6B, left). Then, using this antibody, we performed ChIP assays and we found that c-Myc associates in vivo to the E box region (Figure 6B, middle). To further confirm the in vivo interaction established between c-Myc and ZO-2, we immunoprecipitated ZO-2 from nuclear extracts derived from MDCK cells, and we detected by Western blot the presence of c-Myc in the immunoprecipitate (Figure 6C).



**Figure 4.** ZO-2 repression is mediated by a putative E2F/E box located in the cyclin D1 promoter. (A) The effects of punctual mutations on cyclin D1 promoter, depicted as X in the TRE(AP-1) (change TGAGTCA→CGGTACC) and CRE (change TAACGTCA→TAAAGCTT) sites, were monitored by reporter assays done under a control condition and under the influence of ZO-2 overexpression. MDCK cells were transfected with 1  $\mu$ g of pXP2-CD1, the TRE(AP-1) and CRE mutant constructs or one of these constructs together with 2  $\mu$ g of pGW1-HA-ZO-2. Relative luciferase activities are expressed as a percentage of the activity of the control (pXP2-CD1 alone). (B) Cyclin D1 promoter constructs with diverse deletions over the E2F binding site were analyzed under a control condition and under the influence of ZO-2 overexpression. MDCK cells were transfected with 1  $\mu$ g of pXP2-CD1 or the E2F binding site deletions constructs alone or together with



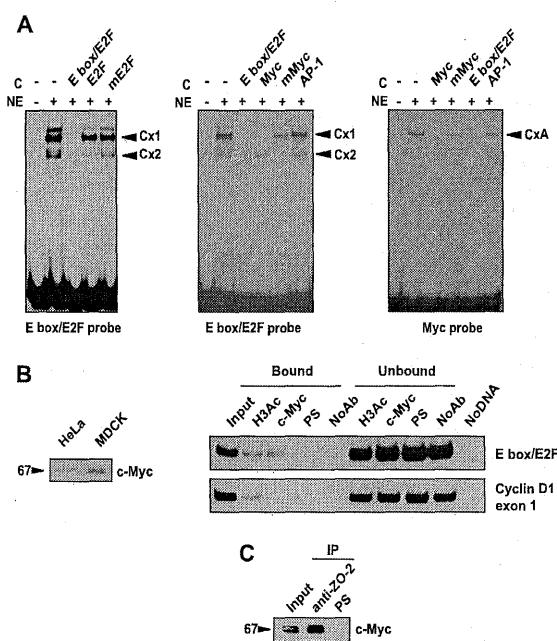
**Figure 5.** ZO-2 associates in vivo to an E box element in the cyclin promoter. (A) Schematic localization of specific primers used for PCR reactions in ChIP assays designed for the dog cyclin D1 promoter. Amplification of exon 1 was used as a negative control. (B) ChIP assays performed in sparse MDCK cells reveal the association of ZO-2 with an E box and not to the TRE(AP-1) element also present in the cyclin D1 promoter. The sizes of the amplified regions are 269 base pairs for the E box region, 200 base pairs for the TRE(AP-1) area, and 200 base pairs for exon 1. In this and the following ChIP assays, positive controls with H3Ac or H3 and negative controls with preimmune serum (PS) and no antibody (NoAb) were included. Input DNA, bound, unbound and no DNA reactions were amplified with the same set of primers as additional negative controls. (C) ChIP assay to detect recombinant ZO-2 were performed in cells that overexpress ZO-2 (pGW1-HA-ZO-2). Immunoprecipitates done with antibodies against ZO-2 and HA confirm interaction of native and transfected ZO-2 (HA-tagged ZO-2) with the E box. Representative images of radioactive PCR products are shown. At least two independent experiments were performed in all ChIP assays.

These experiments thus demonstrated that c-Myc binds to the E box region docking ZO-2 to the cyclin D1 promoter.

#### c-Myc Cooperates with ZO-2 in Down-regulating Cyclin D1 Transcription

Next, we explored the effect of c-Myc on cyclin D1 promoter activity by using functional assays in MDCK cells. First, we transfected into MDCK cells a plasmid carrying human c-Myc and observed overexpression of this protein (Figure 7A). Next, we performed cotransfection assays with the p2-CD1 reporter and different amounts of the plasmid that overexpresses human c-Myc (Figure 7B). We found that c-Myc acts as a repressor for the cyclin D1 promoter. When we tested a deletion construct lacking the E box element,

**Figure 4 (cont).** 2  $\mu$ g of pGW1-HA-ZO-2. Relative luciferase activity are expressed as a percentage of the activity of pXP2-CD1/pGW1 as the control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , Student's *t* test. At the left, mutagenesis sites and deletions are indicated. (C) In silico analysis of the cyclin D1 promoter sequence, located between -708 and -540, finds the presence of an E box and reveals a putative E2F binding site. Chosen restriction enzymes are indicated.



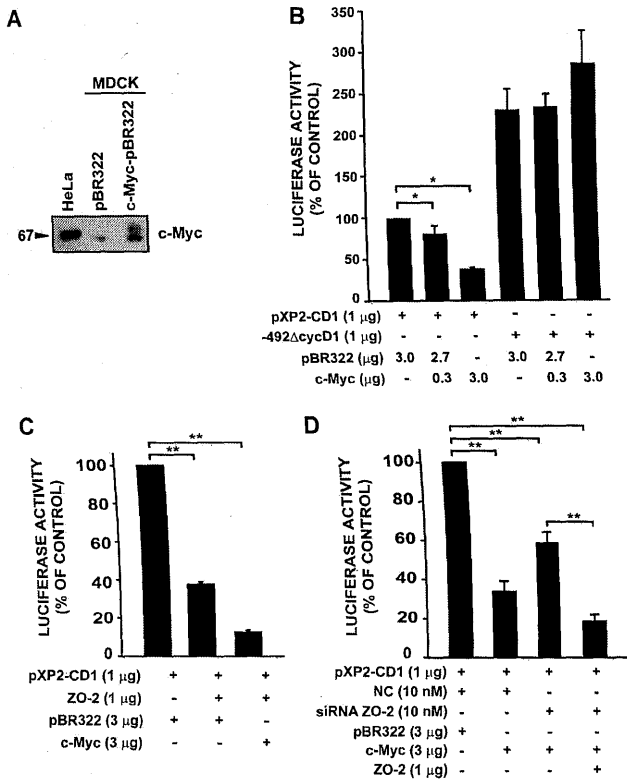
**Figure 6.** c-Myc recognizes the E box region in cyclin D1 promoter. (A) Gel shift assays done with the indicated  $^{32}$ P-end-labeled oligonucleotide. Left, E box/E2F probe interaction with proteins present in the nuclear extract (NE) was competed (C stands for competitor added) with a nonlabeled E box/E2F oligonucleotide and E2F consensus or mutant oligonucleotides. Middle, E box/E2F labeled oligonucleotide was competed with consensus c-Myc probe, the corresponding mutant c-Myc or AP-1 as a heterologous competitor. Right, consensus c-Myc was used as labeled probe for reverse competition. Black arrowheads on the right indicate the position of the specific complexes (Cx). All competition experiments were performed in the absence or presence of 100-fold excess of the indicated nonlabeled competitor and 10  $\mu$ g of nuclear extracts obtained from sparse MDCK cells. (B) Left, 60  $\mu$ g of nuclear extracts obtained from sparse MDCK and HeLa cells was subjected to Western blot using an antibody against c-Myc. A 67-kDa band was detected. Right, ChIP assay reveals the in vivo association of c-Myc with the E box present in the cyclin D1 promoter. (C) c-Myc is present in ZO-2 immunoprecipitate. Input, 10% of immunoprecipitation starting material.

c-Myc lost its inhibitory effect on the cyclin D1 promoter. Having demonstrated that ZO-2 and c-Myc independently act as repressors for cyclin D1 transcription, we next investigated the effect of cotransfecting both proteins on cyclin D1 promoter activity.

Figure 7C illustrates how the overexpression of both ZO-2 and c-Myc together exerted a synergistic effect that enhanced the repressive effect on cyclin D1 transcription. These data thus demonstrated that c-Myc cooperates with ZO-2 in down-regulating cyclin D1 transcription.

The results shown in Figure 7D indicated that full repressor activity is achieved when c-Myc is present in combination with ZO-2. A significant recovery in activity is observed when cells were treated with ZO-2 siRNA, decreasing ZO-2 levels; overexpression of recombinant ZO-2 abolished the effect of previously transfected ZO-2 siRNA.

To relate c-Myc/ZO-2 cooperative repressive action on cyclin D1 with cell proliferation, MDCK cells were cotransfected with both c-Myc- and ZO-2-expressing plasmids, and cell proliferation rates were determined. [ $^3$ H]Thymidine incorporation and MTT detection indicated that under this

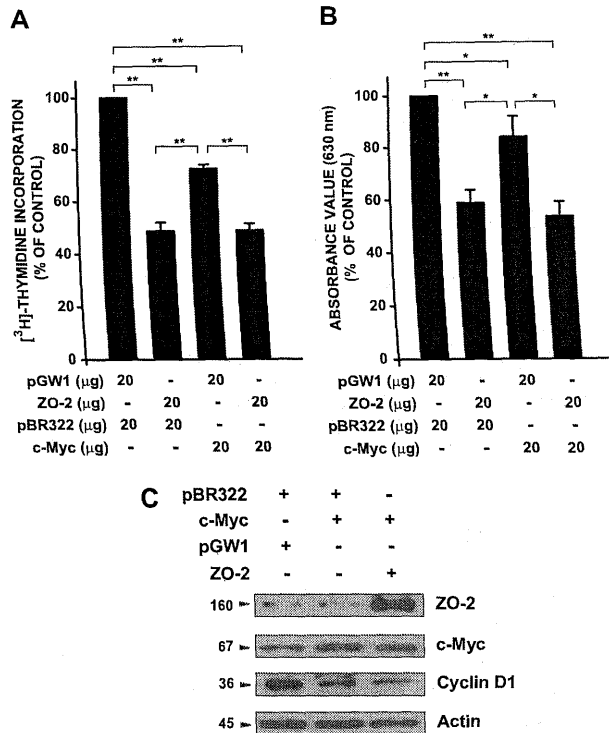


**Figure 7.** c-Myc cooperates with ZO-2 in down-regulating the cyclin D1 promoter. (A) Western blot done with c-Myc antibody reveals how c-Myc is overexpressed in MDCK cells transfected with the c-Myc-LTR/pBR322 or the empty vector LTR/pBR322 (indicated as pBR322). HeLa cell extract was included as a positive control. (B) c-Myc overexpression represses cyclin D1 promoter activity in a dose-dependent manner and displays specificity for the E box element. This assay was done with sparse MDCK cells transfected with 1 μg of the intact cyclin D1 promoter construct (pXP2-CD1) or with a plasmid lacking E box/E2F element (-492ΔCycD1) and indicated amounts of c-Myc-LTR/pBR322 plasmid or the empty vector LTR/pBR322. (C) Simultaneous overexpression of c-Myc and ZO-2 enhanced the repression of cyclin D1 promoter activity. MDCK cells were cotransfected as indicated with different combinations of the following plasmids: pXP2-CD1, ZO-2, pBR322, and c-Myc. (D) Addition of ZO-2 siRNA modifies c-Myc repression abilities. Over a constant c-Myc expression, ZO-2 siRNA but not NC interferes with repression. Recombinant ZO-2 expression abrogates the ZO-2 siRNA effect. Relative luciferase activities are expressed as a percentage of the control activity (pXP2-CD1/pBR322 or in combination with NC siRNA). Data are mean values ± SE of at least three independent experiments (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , Student's  $t$  test).

condition, cell proliferation was inhibited (Figure 8). Immunodetection of cyclin D1 indicated that coexpression of both repressors (c-Myc and ZO-2) resulted in a diminished amount of the 36-kDa protein (Figure 8C).

#### HDAC1 Cooperates with ZO-2/c-Myc in Repressing Cyclin D1 Transcription

Histone acetylation and deacetylation are major regulatory transcription mechanisms that function by modulating the accessibility of transcription factors to their cognate binding sites on DNA. Consequently, a common feature of mammalian transcriptional repressors is the

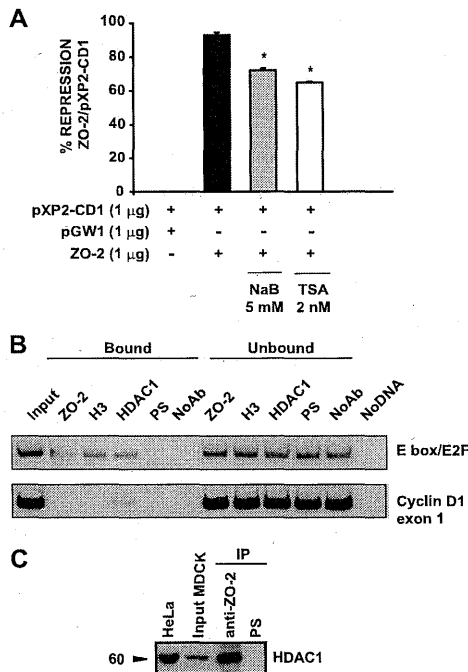


**Figure 8.** Myc/ZO-2 down-regulates cell proliferation. Cell proliferation assessed by  $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation (A) and by MTT method (B) in MDCK cells transiently cotransfected (electroporated) with 40 μg of combined vectors for 48 h as indicated in the figure. Results are expressed as a percentage of the empty vectors value (control). Bioassays were performed with each value being determined in triplicate. Mean values ± SE of at least three independent experiments are plotted. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , Student's  $t$  test. (C) Immunodetection of indicated proteins was performed as described in Figure 2 in the same cells electroporated as in A or B.

promoter-specific recruitment of HDACs (Ng and Bird, 2000; Free *et al.*, 2001).

Because our results have shown that ZO-2 and c-Myc behave as repressors, we next explored whether HDAC proteins participated in this process. For this purpose, MDCK cells were cotransfected with the cyclin D1 promoter construct and the ZO-2 expression vector and then treated for 12 h with the HDAC inhibitors trichostatin A or sodium butyrate. Figure 9A shows how ZO-2 repression activity diminished in the presence of either one of the inhibitors.

To determine whether HDAC was associated to the E box region of the cyclin D1 promoter, we performed a ChIP assay by using MDCK cells that overexpressed ZO-2. Because HDAC1 is expressed in MDCK cells (Peinado *et al.*, 2004), we used a specific antibody directed against it. Figure 9B shows that HDAC1 is indeed recruited to the E box region when ZO-2 is overexpressed in MDCK cells. To further confirm this *in vivo* interaction, we performed an immunoprecipitation experiment that revealed HDAC1 was present in a ZO-2 nuclear immunoprecipitate (Figure 9C). Together, these results highlight HDAC1 as a participant in the down-regulation of cyclin D1 transcription mediated by ZO-2 and c-Myc. A model that recapitulates our findings is presented in Figure 10.

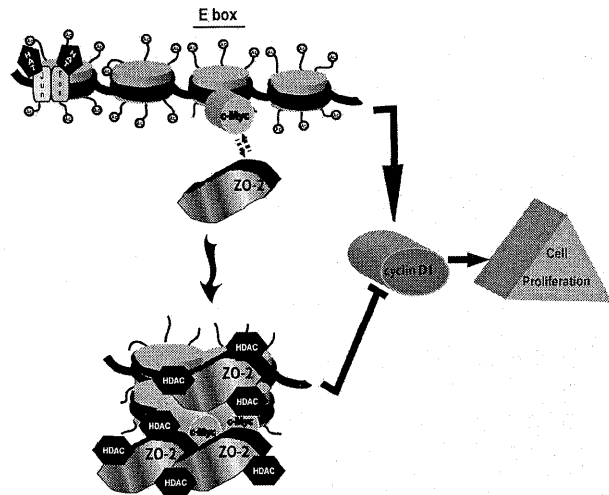


**Figure 9.** HDAC1 are recruited and participate in the negative effect mediated by ZO-2 and c-Myc on cyclin D1 transcription. (A) Participation of HDACs in the repression mediated by ZO-2/c-Myc. MDCK cells were transiently cotransfected with pXP2-CD1 reporter plasmid and pGW1-HA-ZO-2 and treated with HDAC inhibitors TSA (2 nM) and NaB (5 mM) for 12 h before harvesting. Results are presented as the percentage of repression exerted by ZO-2 under each treatment related to nontreated cells. Mean values  $\pm$  SE of at least three independent experiments (\* $p < 0.05$ , Student's *t* test). (B) ChIP assay reveals the interaction of HDAC1 with the E box present in the cyclin D1 promoter. (C) HDAC1 is present in ZO-2 immunoprecipitate derived from nuclear extracts of sparse MDCK cells. A 60-kDa band was detected in the MDCK input and immunoprecipitation (IP) and in control HeLa cells. Input, 10% of immunoprecipitation starting material.

**DISCUSSION**

The role of ZO-2 in the nucleus has started to be unraveled. Our work with reporter genes under the control of AP-1-regulated promoters revealed the participation of ZO-2 in the repression of gene transcription (Betanzos *et al.*, 2004). Because TJs seem to be involved in the regulation of cell proliferation, we analyzed whether ZO-2 was able to affect the transcription of cyclin D1, a key regulator of the cell cycle. Our results indicated that ZO-2 in a complex with c-Myc and HDAC1 repressed the transcription of the cyclin D1 gene. This repression seemed to be physiologically relevant, because cells overexpressing ZO-2 exhibited a diminished cell proliferation rate as determined through [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation and wound healing assays.

The relationship among TJ proteins, gene transcription, and cell proliferation was uncovered with the pioneering work of Balda and Matter. They revealed how ZO-1 inhibited G1/S phase transition by cytoplasmic sequestration of ZONAB, a transcription factor that forms a complex with CDK4 (Balda and Matter, 2000; Balda *et al.*, 2003). Moreover, they showed that upon ZONAB overexpression cyclin D1 gene expression became up-regulated, whereas the expression of the SH3 domain of ZO-1, which inhibits ZONAB



**Figure 10.** ZO-2, c-Myc, and HDAC1 interact in the cyclin D1 E box promoter region blocking cell proliferation. HAT, histone acetyl transferase.

function, induced only a small inhibition of the cyclin D1 promoter (Sourisseau *et al.*, 2006). The latter observation is in accordance with our present findings in MDCK cells that revealed that in contrast to ZO-2, ZO-1 transfection exerted no direct effect on the activity of the human cyclin D1 promoter (Figure 2B). These results demonstrated that each of these proteins exerted a particular function not shared by other ZO proteins.

Because ZO proteins do not have the characteristic features in their sequence that allow binding to DNA, they might form complexes with other proteins, such as transcription factors, to regulate gene transcription. The interaction between ZO-1 with ZONAB and ZO-2 with Jun, Fos, and C/EBP has confirmed this proposal and has allowed the exploration of regulatory regions of genes regulated by ZO protein expression.

Our work initially explored TRE(AP-1) and CRE sites of the human cyclin D1 promoter, located at positions -929 to -935 and -45 to -52, respectively. Because the mutation of just one of any of these sites generated a profound loss of promoter activity, it became extremely difficult to appreciate the impact ZO-2 overexpression had on them (Figure 4A). However, we further pursued this point in a ChIP assay done by immunoprecipitating ZO-2 and performing PCR amplification with primers for the TRE site. Because no amplification was obtained, we suspect that ZO-2 is not exerting its inhibitory effect on cyclin D1 transcription through association to the TRE(AP-1) site (Figure 5B). With regard to the CRE site, it should be pointed out that the construct containing the deletion of the E box and that showed no repression upon ZO-2 overexpression still has an intact CRE site (Figure 4B). These results, therefore, suggested that this location is not involved in the inhibition of cyclin D1 transcription triggered by ZO-2 overexpression.

The deletion analysis performed around the E2F site highlighted the importance of the E box in the transcriptional regulation of cyclin D1 modulated by ZO-2 (Figure 4). Structurally different factors of the basic-helix loop-helix (bHLH) type, like c-Myc and USF, or the zinc finger protein family, like Snail, recognize the CAC(A/G)TG sequence that characterizes E box elements (Blackwell *et al.*, 1990; Cole and McMahon, 1999; Nieto, 2002; Corre and Galibert, 2005,

2006). We discarded the participation of Snail in the repression of cyclin D1 mediated by ZO-2, because Snail protein levels are so low in MDCK cells that they escape detection with commercial antibodies (Comijn *et al.*, 2001; Bolos *et al.*, 2003). However, to further address this issue, we performed ChIP assays in MDCK cells that overexpress Snail (generously provided by professor Roberto Montesano, Department of Cell Physiology and Metabolism, University of Geneva Medical Center), and we did not observe interaction of Snail with the E box region of the cyclin D1 promoter (data not shown). The participation of USF and/or E2F transcription factors in cyclin D1 down-regulation by ZO-2 is a matter of current work in our laboratory, because at least in the case of E2F, the electrophoretic mobility shift assays showed effective competition of this factor for complex 2 (Figure 6A, left).

With regards to c-Myc, we demonstrated its ability to bind to the E box element of the cyclin D1 promoter, to repress the promoter activity either alone or in a cooperative manner with ZO-2 (Figures 6 and 7), and to inhibit cell proliferation (Figure 8). Another tumor suppressor known to modulate the transcriptional activity regulated by c-Myc is, for example, Bin1, which interacts with the N-terminal region of c-Myc and inhibits malignant cell proliferation (Elliott *et al.*, 1999).

Besides cyclin D1 (Philipp *et al.*, 1994), other genes repressed in c-Myc-transformed cells included those that encode cell adhesion proteins, such as the  $\beta 1$  integrin subunit (Judware and Culp, 1995); molecules of the immune system, such as major histocompatibility complex class I and lymphocyte function-associated antigen-1 (Bernards *et al.*, 1986; Versteeg *et al.*, 1988; Inghirami *et al.*, 1990); and cell cycle regulators, such as C/EBP $\alpha$  (Freytag and Geddes, 1992) and c-Myc itself (Penn *et al.*, 1990). These findings suggested that gene repression contributes significantly to the phenotype of c-Myc transformed cells. Formation of Myc:Max heterodimers is essential for both Myc-dependent transcriptional activation and gene repression (Mao *et al.*, 2003). Other combinations of c-Myc heterodimers have been described that recruit remodeling enzymes, such as HDACs, and exert a repressing effect. Such is the case of MM-1, a novel c-Myc-binding protein that interferes with the E box-dependent transcription activity of c-Myc (Mori *et al.*, 1998). In HeLa cells, c-Myc repression is controlled by a complex containing c-Myc, MM-1, the corepressors mSin3 and TIF1 $\beta$ , and HDAC1 (Satou *et al.*, 2001). Here, we have described the formation of a complex consisting of ZO-2, c-Myc, and HDAC1 that participates in the negative regulation of cyclin D1; however, we cannot rule out the inclusion of other components in this complex.

In summary, we can conclude that ZO-2 inhibits the transcription of cyclin D1 by forming a complex that includes c-Myc and HDAC1, and this complex associates with the E box present in the cyclin D1 promoter (Figure 10). The interaction of ZO-2 with this complex is important for understanding the role played by TJ proteins in the regulation of cell proliferation and tumorigenesis.

## ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the technical assistance of Matilde Corona, Gerardo Marmolejo, Socorro Islas, Guadalupe Aguilar, Ricardo Valle, Georgina Guerrero, Inti de la Rosa, and Hector Rincón. Miriam Huerta, Rodrigo Muñoz, Rocío Tapia, and Ernesto Soto-Reyes were recipients of doctoral fellowships from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (159492, 183731, 166727, and 181389). We thank Irma Cruz-Solis for the kind donation of pSoxCAT. This work was supported by grants 41273-A and 50414 from CONACyT (to E.L.-B.) and 45691-Q (to L.G.-M.).

## REFERENCES

- Adhikary, S., and Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 635–645.
- Albanese, C. *et al.* (1999). Activation of the cyclin D1 gene by the E1A-associated protein p300 through AP-1 inhibits cellular apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 34186–34195.
- Albanese, C., Johnson, J., Watanabe, G., Eklund, N., Vu, D., Arnold, A., and Pestell, R. G. (1995). Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J. Biol. Chem.* 270, 23589–23597.
- Arber, N., Hibshoosh, H., Moss, S. F., Sutter, T., Zhang, Y., Begg, M., Wang, S., Weinstein, I. B., and Holt, P. R. (1996). Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology* 110, 669–674.
- Balda, M. S., Garrett, M. D., and Matter, K. (2003). The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J. Cell Biol.* 160, 423–432.
- Balda, M. S., and Matter, K. (2000). The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO J.* 19, 2024–2033.
- Bernards, R., Dessain, S. K., and Weinberg, R. A. (1986). N-myc amplification causes down-modulation of MHC class I antigen expression in neuroblastoma. *Cell* 47, 667–674.
- Betzanos, A., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., Azuara, E., Amerena, J., and Gonzalez-Mariscal, L. (2004). The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 292, 51–66.
- Blackwell, T. K., Kretzner, L., Blackwood, E. M., Eisenman, R. N., and Weintraub, H. (1990). Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science* 250, 1149–1151.
- Bolos, V., Peinado, H., Perez-Moreno, M. A., Fraga, M. F., Esteller, M., and Cano, A. (2003). The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors. *J. Cell Sci.* 116, 499–511.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Cicatiello, L. *et al.* (2004). Estrogens and progesterone promote persistent CCND1 gene activation during G1 by inducing transcriptional derepression via c-Jun/c-Fos/estrogen receptor (progesterone receptor) complex assembly to a distal regulatory element and recruitment of cyclin D1 to its own gene promoter. *Mol. Cell Biol.* 24, 7260–7274.
- Cole, M. D., and McMahon, S. B. (1999). The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene* 18, 2916–2924.
- Comijn, J., Bex, G., Vermassen, P., Verschueren, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huybreck, D., and van Roy, F. (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol. Cell* 7, 1267–1278.
- Coqueret, O. (2002). Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 299, 35–55.
- Corre, S., and Galibert, M. D. (2005). Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. *Pigment Cell Res.* 18, 337–348.
- Corre, S., and Galibert, M. D. (2006). USF as a key regulatory element of gene expression. *Med. Sci.* 22, 62–67.
- Chlenski, A., Ketels, K. V., Engeriser, J. L., Talamonti, M. S., Tsao, M. S., Koutnikova, H., Oyasu, R., and Scarpelli, D. G. (1999). *zo-2* gene alternative promoters in normal and neoplastic human pancreatic duct cells. *Int. J. Cancer* 83, 349–358.
- Chlenski, A., Ketels, K. V., Korovaitseva, G. I., Talamonti, M. S., Oyasu, R., and Scarpelli, D. G. (2000). Organization and expression of the human *zo-2* gene (*tjp-2*) in normal and neoplastic tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 1493, 319–324.
- De Craene, B., van Roy, F., and Bex, G. (2005). Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. *Cell Signal.* 17, 535–547.
- Elliott, K. *et al.* (1999). Bin1 functionally interacts with Myc and inhibits cell proliferation via multiple mechanisms. *Oncogene* 18, 3564–3573.
- Free, A., Grunstein, M., Bird, A., and Vogelauer, M. (2001). Histone deacetylation: mechanisms of repression. In: *Chromatin Structure and Gene Expression*, ed. S.R.C. Elgin and J. L. Workman, New York: Oxford University Press, 156–181.



- Freytag, S. O., and Geddes, T. J. (1992). Reciprocal regulation of adipogenesis by Myc and C/EBP alpha. *Science* 256, 379-382.
- Fukami-Kobayashi, J., and Mitsui, Y. (1998). The regulation of cyclin D1 expression in senescent human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 241, 435-444.
- Glaunsinger, B. A., Weiss, R. S., Lee, S. S., and Javier, R. (2001). Link of the unique oncogenic properties of adenovirus type 9 E4-ORF1 to a select interaction with the candidate tumor suppressor protein ZO-2. *EMBO J.* 20, 5578-5586.
- Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., and Avila-Flores, A. (2000). MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11, 315-324.
- Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., and Jaramillo, B. E. (2003). Tight junction proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 81, 1-44.
- Gonzalez-Mariscal, L., Ponce, A., Alarcon, L., and Jaramillo, B. E. (2006). The tight junction protein ZO-2 has several functional nuclear export signals. *Exp. Cell Res.* 312, 3323-3335.
- Harbour, J. W., and Dean, D. C. (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* 14, 2393-2409.
- Herber, B., Truss, M., Beato, M., and Muller, R. (1994). Inducible regulatory elements in the human cyclin D1 promoter. *Oncogene* 9, 2105-2107.
- Hernandez, S., Chavez Munguia, B., and Gonzalez-Mariscal, L. (2007). ZO-2 silencing in epithelial cells perturbs the gate and fence function of tight junctions and leads to an atypical monolayer architecture. *Exp. Cell Res.* 313, 1533-1547.
- Hsu, E. M., McNicol, P. J., Guijon, F. B., and Paraskevas, M. (1993). Quantification of HPV-16 E6-E7 transcription in cervical intraepithelial neoplasia by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Int. J. Cancer* 55, 397-401.
- Inghirami, G., Grignani, F., Sternas, L., Lombardi, L., Knowles, D. M., and Dalla-Favera, R. (1990). Down-regulation of LFA-1 adhesion receptors by C-myc oncogene in human B lymphoblastoid cells. *Science* 250, 682-686.
- Islas, S., Vega, J., Ponce, L., and Gonzalez-Mariscal, L. (2002). Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 274, 138-148.
- Jaramillo, B. E., Ponce, A., Moreno, J., Betanzos, A., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., and Gonzalez-Mariscal, L. (2004). Characterization of the tight junction protein ZO-2 localized at the nucleus of epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 297, 247-258.
- Jones, T. R., and Cole, M. D. (1987). Rapid cytoplasmic turnover of c-myc mRNA: requirement of the 3' untranslated sequences. *Mol. Cell. Biol.* 7, 4513-4521.
- Judware, R., and Culp, L. A. (1995). Over-expression of transfected N-myc oncogene in human SKNSH neuroblastoma cells down-regulates expression of beta integrin subunit. *Oncogene* 11, 2599-2607.
- Kleine-Kohlbrecher, D., Adhikary, S., and Eilers, M. (2006). Mechanisms of transcriptional repression by Myc. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 302, 51-62.
- Lopez-Bayghen, E., Vega, A., Cadena, A., Granados, S. E., Jave, L. F., Gariglio, P., and Alvarez-Salas, L. M. (1996). Transcriptional analysis of the 5'-noncoding region of the human involucrin gene. *J. Biol. Chem.* 271, 512-520.
- Mao, D. Y., Watson, J. D., Yan, P. S., Barsyte-Lovejoy, D., Khosravi, F., Wong, W. W., Farnham, P. J., Huang, T. H., and Penn, L. Z. (2003). Analysis of Myc bound loci identified by CpG island arrays shows that Max is essential for Myc-dependent repression. *Curr. Biol.* 13, 882-886.
- Mori, K., Maeda, Y., Kitaura, H., Taira, T., Iguchi-Ariga, S. M., and Ariga, H. (1998). MM-1, a novel c-Myc-associating protein that represses transcriptional activity of c-Myc. *J. Biol. Chem.* 273, 29794-29800.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- Ng, H. H., and Bird, A. (2000). Histone deacetylases: silencers for hire. *Trends Biochem. Sci.* 25, 121-126.
- Nieto, M. A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 155-166.
- Ohtsubo, M., and Roberts, J. M. (1993). Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science* 259, 1908-1912.
- Peinado, H., Ballestar, E., Esteller, M., and Cano, A. (2004). Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol. Cell. Biol.* 24, 306-319.
- Penn, L. J., Brooks, M. W., Laufer, E. M., and Land, H. (1990). Negative autoregulation of c-myc transcription. *EMBO J.* 9, 1113-1121.
- Peukert, K., Staller, P., Schneider, A., Carmichael, G., Hanel, F., and Eilers, M. (1997). An alternative pathway for gene regulation by Myc. *EMBO J.* 16, 5672-5686.
- Philipp, A., Schneider, A., Vasrik, I., Finke, K., Xiong, Y., Beach, D., Alitalo, K., and Eilers, M. (1994). Repression of cyclin D 1, a novel function of MYC. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4032-4043.
- Quelle, D. E., Ashmun, R. A., Shurtleff, S. A., Kato, J. Y., Bar-Sagi, D., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (1993). Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev.* 7, 1559-1571.
- Satou, A., Taira, T., Iguchi-Ariga, S. M., and Ariga, H. (2001). A novel transcription pathway of c-Myc. Recruitment of a transcriptional corepressor complex to c-Myc by MM-1, a c-Myc-binding protein. *J. Biol. Chem.* 276, 46562-46567.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., and Ben-Ze'ev, A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5522-5527.
- Sourisseau, T., Georgiadis, A., Tsapara, A., Ali, R. R., Pestell, R., Matter, K., and Balda, M. S. (2006). Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2387-2398.
- Thierry, F., Spyrou, G., Yaniv, M., and Howley, P. (1992). Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J. Virol.* 66, 3740-3748.
- Traweger, A., Fang, D., Liu, Y. C., Stelzhammer, W., Krizbai, I. A., Fresser, F., Bauer, H. C., and Bauer, H. (2002). The tight junction-specific protein occludin is a functional target of the E3 ubiquitin-protein ligase itch. *J. Biol. Chem.* 277, 10201-10208.
- Versteeg, R., Noordermeer, I. A., Kruse-Wolters, M., Ruiter, D. J., and Schrier, P. I. (1988). c-myc down-regulates class I HLA expression in human melanomas. *EMBO J.* 7, 1023-1029.
- Wang, L. D., Shi, S. T., Zhou, Q., Goldstein, S., Hong, J. Y., Shao, P., Qiu, S. L., and Yang, C. S. (1994). Changes in p53 and cyclin D1 protein levels and cell proliferation in different stages of human esophageal and gastric-cardia carcinogenesis. *Int. J. Cancer* 59, 514-519.
- Watanabe, G., Albanese, C., Lee, R. J., Reutens, A., Vairo, G., Henglein, B., and Pestell, R. G. (1998). Inhibition of cyclin D1 kinase activity is associated with E2F-mediated inhibition of cyclin D1 promoter activity through E2F and Sp1. *Mol. Cell. Biol.* 18, 3212-3222.
- Watanabe, G., Howe, A., Lee, R. J., Albanese, C., Shu, I. W., Karnezis, A. N., Zou, L., Kyriakis, J., Rundell, K., and Pestell, R. G. (1996). Induction of cyclin D1 by simian virus 40 small tumor antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 12861-12866.
- Wei, Q., Miskimins, W. K., and Miskimins, R. (2004). Sox10 acts as a tissue-specific transcription factor enhancing activation of the myelin basic protein gene promoter by p27Kip1 and Sp1. *J. Neurosci. Res.* 78, 796-802.
- Willott, E., Balda, M. S., Fanning, A. S., Jameson, B., Van Itallie, C., and Anderson, J. M. (1993). The tight junction protein ZO-1 is homologous to the Drosophila discs-large tumor suppressor protein of septate junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7834-7838.
- Zhang, S. Y., Liu, S. C., Goodrow, T., Morris, R., and Klein-Szanto, A. J. (1997). Increased expression of G1 cyclins and cyclin-dependent kinases during tumor progression of chemically induced mouse skin neoplasms. *Mol. Carcinog.* 18, 142-152.
- Zhang, Z. K., Davies, K. P., Allen, J., Zhu, L., Pestell, R. G., Zagzag, D., and Kalpana, G. V. (2002). Cell cycle arrest and repression of cyclin D1 transcription by INI1/hSNF5. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5975-5988.



Review

# Globin genes transcriptional switching, chromatin structure and linked lessons to epigenetics in cancer: A comparative overview <sup>☆</sup>

Georgina Guerrero, Paul Delgado-Olguín, Martín Escamilla-Del-Arenal, Mayra Furlan-Magaril, Eria Rebollar, Inti A. De La Rosa-Velázquez, Ernesto Soto-Reyes, Héctor Rincón-Arano, Christian Valdes-Quezada, Viviana Valadez-Graham, Félix Recillas-Targa <sup>\*</sup>

*Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Genética Molecular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, México, D.F., 04510, Mexico*

Received 6 April 2006; received in revised form 14 September 2006; accepted 22 October 2006  
Available online 11 November 2006

## Abstract

At the present time research situates differential regulation of gene expression in an increasingly complex scenario based on interplay between genetic and epigenetic information networks, which need to be highly coordinated. Here we describe in a comparative way relevant concepts and models derived from studies on the chicken  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin group of genes. We discuss models for globin switching and mechanisms for coordinated transcriptional activation. A comparative overview of globin genes chromatin structure, based on their genomic domain organization and epigenetic components is presented. We argue that the results of those studies and their integrative interpretation may contribute to our understanding of epigenetic abnormalities, from  $\beta$ -thalassemias to human cancer. Finally we discuss the interdependency of genetic–epigenetic components and the need of their mutual consideration in order to visualize the regulation of gene expression in a more natural context and consequently better understand cell differentiation, development and cancer.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Chromatin; Chromatin domain; Enhancer; Epigenetic; Insulator; Globin genes; Silencer; Transcription

## Contents

1. Introduction . . . . .	751
2. The $\alpha$ - and $\beta$ -globin group of genes: generalities . . . . .	751
3. The chicken $\alpha$ -globin domain and its regulatory components . . . . .	751
4. The chicken $\beta$ -globin domain and regulatory components . . . . .	755
5. The chicken $\alpha$ -globin gene domain and its chromatin organization . . . . .	756
6. The chicken $\beta$ -globin domain and its chromatin organization . . . . .	756
7. Epigenetics and tumour suppressor gene promoters . . . . .	757
8. Conclusions and prospects . . . . .	758
Acknowledgments . . . . .	758
References . . . . .	758

<sup>☆</sup> This paper is part of the 3rd special issue of CBP dedicated to The Face of Latin American Comparative Biochemistry and Physiology organized by Marcelo Hermes-Lima (Brazil) and co-edited by Carlos Navas (Brazil), Rene Belebony (Brazil), Rodrigo Stabeli (Brazil), Tania Zenteno-Savín (Mexico) and the editors of CBP. This issue is dedicated to the memory of two exceptional men, Peter L. Lutz, one of the pioneers of comparative and integrative physiology, and Cicero Lima, oornalist, science lover and Hermes-Lima's dad.

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel.: +52 55 56 22 56 74; fax: +52 55 56 22 56 30.  
E-mail address: [frecilla@ifc.unam.mx](mailto:frecilla@ifc.unam.mx) (F. Recillas-Targa).

## 1. Introduction

Cell lineage commitment in metazoans is established early during development by specific gene expression networks determining highly specific cell differentiation patterns that are mitotically propagated. For several years we have been interested in the relationship between gene regulation and chromatin structure. Epigenetic processes recently emerged as responsible for temporal- and tissue-specific gene expression, not only during cell differentiation and development but also in cancer.

Over the years, comparative genetics had contributed to the understanding of gene organization and conservation among different species (Kosak and Groudine, 2004; Wasserman and Sanderlin, 2004), leading to visualization of a genetic landscape in different organisms. Today, such a view seems to be limited without considering two critical components: the extended non-coding or intergenic sequences and the genome structured into chromatin, i.e., the epigenome. Consequently, to attain an overview of how cellular processes like DNA replication, recombination, DNA repair and differential gene regulation among others occur inside the cell and particularly into the nucleus, we clearly need an integrative genome–epigenome approach (Cremer and Cremer, 2001; Chakalova et al., 2005). Thus a comparative and multidisciplinary approach is nowadays needed to address different genomic processes that could lead us not only to better understand cell physiology but also to propose novel and more effective biomedical strategies to improve human health.

In the present manuscript we present a comparative overview of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin family of genes, with particular emphasis on the regulation of chicken globin domains, their chromatin organization as well as the epigenetic switching mechanisms occurring during cell differentiation and developmental gene expression. Finally, our knowledge about epigenetic mechanisms of aberrant silencing is linked to tumour suppressor gene promoters in cancer.

## 2. The $\alpha$ - and $\beta$ -globin group of genes: generalities

Since their genomic sequence isolation, globin genes have been one of the most studied loci contributing to the generation of a long list of new concepts and revealing regulatory mechanisms, which are now been extrapolated to other genomic loci in diverse organisms. Part of those observations allowed the introduction of the transcriptional active domain concept that was previously anticipated from cytological evidences, in particular the differential chromosomal band staining (Cremer and Cremer, 2001; Razin et al., 2003). For more than 15 years we have been interested in the study of the chicken  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin group of genes (Farache et al., 1990; Recillas-Targa, 2000; Burgess-Beusse et al., 2002; Rincón-Arano et al., 2005). Those investigations have constantly been busted by the large amount of data generated on human and mouse genomes (Stamatoyannopoulos, 2005; Higgs et al., 2005). Even with such accumulation of data and progress, the chicken  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin loci remain as an apparent endless source of new information

contributing to novel views for differential gene expression and chromatin conformation at the domain scale, allowing constant proposals for new models.

As in other organisms, the chicken  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin domains differentially and coordinately express their genes, which encode distinct types of hemoglobins with variations of oxygen affinity determining their physiological role during development. Each set of genes is grouped as a cluster, which are located in distinct chromosomes, the minichromosome 14 for the  $\alpha$ -globin group of genes and the chromosome 1 for the  $\beta$ -globin domain in the chicken.

## 3. The chicken $\alpha$ -globin domain and its regulatory components

The chicken  $\alpha$ -globin domain is contained in a genomic region of around 40 kilo bases (kb) with an embryonic  $\pi$  gene and two adult  $\alpha^D$  and  $\alpha^A$  genes that are differentially regulated during erythroid differentiation and development (Fig. 1; Recillas-Targa, 2000; Recillas-Targa and Razin, 2001). A series of erythroid-specific and constitutive DNase I hypersensitive sites (DHS) have been identified all along the domain, including the intergenic DHS and those corresponding to individual regulatory elements like promoters, enhancers and structural chromatin components (Fig. 1). Individual promoters contain the classical set of nuclear factor binding sites present in the great majority of other globin genes (Stamatoyannopoulos, 2005; Dean, 2006). Interestingly, a recent publication demonstrated that Sox6 is involved specifically in the  $\epsilon$ -globin gene silencing in definitive erythropoiesis at the mouse  $\beta$ -globin locus (Yi et al., 2006). We hypothesize that Sox6 may contribute, through chromatin remodeling, to the autonomous silencing of the embryonic  $\pi$  gene when adult genes are needed to

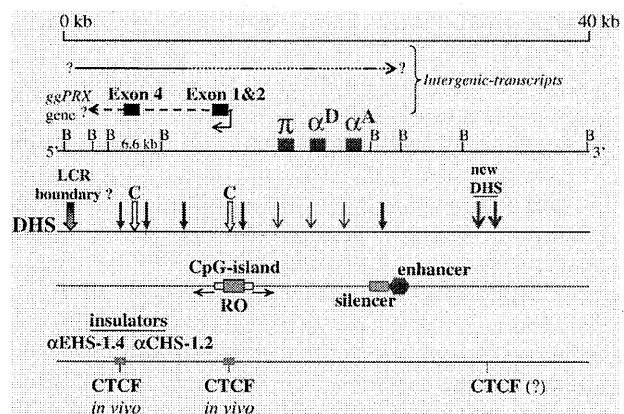


Fig. 1. The chicken  $\alpha$ -globin domain regulatory and chromatin structure elements. The embryonic  $\pi$  gene, and adult  $\alpha^D$  and  $\alpha^A$  genes are shown. *Bam*HI restriction enzyme recognition sites are indicated (B). Intergenic transcripts are presented, although their starting and ending points are not clearly known. Part to the *ggPRX* gene transcript I represented. Distribution of DNase I hypersensitive sites (DHS) is indicated by vertical arrows, with alternate presence of two constitutive (C) sites on the domain 5'-side. Regulatory elements upstream and downstream of the  $\alpha$ -globin genes are shown. The two newly defined insulators are located at the domain 5'-side ( $\alpha$ EHS-1.4 and  $\alpha$ CHS-1.2) and the *in vivo* CTCF binding is indicated.

be expressed. This is an aspect that we are currently investigating in our laboratory. Thus, apparent minor differences in terms of the set of nuclear factors interacting at individual promoters may contribute, in part, to the differential  $\alpha$ -globin gene expression.

A set of hematopoietic transcription factors seems to be recurrently present in the great majority of globin *cis*-regulatory elements; such set includes GATA-1, GATA-2, EKLF, NF-E2 and PU.1 among other erythroid and ubiquitous nuclear factors (Huo and Zhang, 2005). The two main erythroid transcription factors are GATA-1 and GATA-2, which correspond to zinc finger nuclear factors. GATA-1 is required for erythroid precursor cells maturation and interacts with all globin regulatory elements with positive and negative effects, mediated by an increasing number of co-factor interactions, over gene expression. In particular, GATA-1 interacts with a bivalent co-factor named *Friend Of GATA* (FOG) that is able to recruit histone acetylases (HAT) or histone deacetylases (HDAC) (Cantor and Orkin, 2005). FOG-1 co-repressor effect is mediated through its interaction with the ATP-dependent remodeling complex NuRD (Hong et al., 2005). More recently, it has been proposed that GATA-1 interaction with FOG-1 is needed for the formation of a tissue-specific chromatin loop that facilitates long-range enhancer function (Vakoc et al., 2005). Furthermore, GATA-1 can interact with the myeloid and lymphoid specific factor PU.1 with (positive or negative) effects on erythroid and myeloid differentiation (Stopka et al., 2005; Liew et al., 2006). Data from our laboratory demonstrated GATA-1 physical contact with the bivalent transcription factor YY1 that contributes to the negative modulation of the chicken 3'-side  $\alpha$ -globin enhancer (Rincón-Arano et al., 2005). In addition, Boyes et al. (1998) demonstrated that GATA-1 can be acetylated by CBP/p300 HAT, increasing its DNA binding affinity with stimulatory GATA-1-dependent transcription effects. In summary, GATA-1 is a critical erythroid factor with multifaceted regulatory behavior. GATA-2 can also be acetylated but in contrast to GATA-1, it regulates early erythropoiesis in immature progenitors, and when associated with co-factors plays repressive or activating roles on transcription regulation (Huo and Zhang, 2005).

The erythroid krüppel-like factor (EKLF) influences chromatin organization of globin loci during differentiation by recruiting HATs and HDACs. EKLF binds the CACCC sequence motif present in enhancer and LCR elements, and is expressed in erythroid, megakaryocytic and mast cells (Huo and Zhang, 2005). A recent publication showed the isolation and characterization of the chicken EKLF gene that is expressed in the posterior primitive streak, which gives rise to hematopoietic cells, then in the blood islands and in circulating blood cells (Chervenak et al., 2006).

NF-E2 is a heterodimer that belongs to the small Maf proteins family composed by the ubiquitous NF-E2p18 (also known as MafK) and the hematopoietic-specific subunit NF-E2p45 (Andrews et al., 1993). NF-E2 is a leucine-zipper transcriptional activator that binds the consensus sequence TGCTGA(G/C)TCA found in erythroid-specific regulatory elements (Huo and Zhang, 2005). NF-E2 exerts its activator function by recruit-

ment of chromatin remodeling complexes and participates in long-range transfer of RNA polymerase II to globin promoters (Johnson et al., 2001; Huo and Zhang, 2005). More recently, NF-E2p45 subunit has been found to be sumoylated *in vivo* in human erythroid K562 cells (Shyu et al., 2005). NF-E2p45 sumoylation increases NF-E2 *trans*-activation potential together with its DNA binding affinity besides favoring relocation of NF-E2p18 and NF-E2p45 subunits inside the nucleus (Francastel et al., 2001), with consequences on erythroid maturation (Shyu et al., 2005).

In conclusion, erythroid transcription factors interact with tissue-specific and ubiquitous proteins including chromatin modifiers, which in turn could favor the establishment of particular chromatin configurations at specific regulatory elements, affecting epigenetic erythroid gene regulation. However the challenge now is to integrate this information with the aim to understand gene regulation in the context of epigenome and nuclear dynamics (Chakalova et al., 2005; West and Fraser, 2005).

Promoters and silencer-enhancer elements had been identified at the chicken 3'-side of  $\alpha$ -globin locus, located around 450 base pairs (bp) downstream of the adult  $\alpha^A$  gene (Fig. 1; Recillas Targa et al., 1993; Rincón-Arano et al., 2005). The 3'-side  $\alpha$ -globin enhancer is a strong regulatory element capable to activate individual promoters in a regulated way even though the precise mechanisms are under investigation in our group. The enhancer possesses a modest similarity with the chicken  $\beta^A/\epsilon$  enhancer of the  $\beta$ -globin domain (Reitman and Felsenfeld, 1988), however recent observations from our group determined that the  $\alpha$ -globin enhancer is more complex than initially thought (Fig. 2A and C; Rincón-Arano et al., 2005). *In vitro* DNase I footprinting experiments demonstrated multiple interactions of nuclear factors with a DNA fragment of around 400 bp (Fig. 2A and C). Furthermore, we identified a relatively long DNA fragment of 120 bp highly conserved between duck and chicken that turned out to include a fourth GATA-1, in addition to NF-E2 and EKLF binding motifs (Fig. 2B; Recillas Targa et al., 1993). Other factors like Sp1 also interact with such region; in addition, we recently demonstrated the presence of the bivalent YY1 nuclear factor (Fig. 2C; Rincón-Arano et al., 2005). We have also shown that the enhancer activity could be modulated in early erythroid stages, at least to some extent, by the action of YY1 and its associated co-factors, probably through affecting the local chromatin structure (Rincón-Arano et al., 2005). In addition, co-immunoprecipitation and pull-down experiments demonstrated a novel physical interaction between GATA-1 and YY1 that influences enhancer action. Point mutations of YY1 and GATA-1 motifs were tested in transient transfections. The results confirmed that GATA-1 and YY1 association is in part responsible for the down-regulation of the enhancer function in early erythroid stages (Rincón-Arano et al., 2005).

Thus we demonstrated that the 3'-side chicken  $\alpha$ -globin enhancer is differentially activated during distinct erythroid differentiation stages and that YY1-GATA-1 interaction contributes to the plasticity of the enhancer function. Furthermore, the potential combinatorial distribution of DNA binding proteins

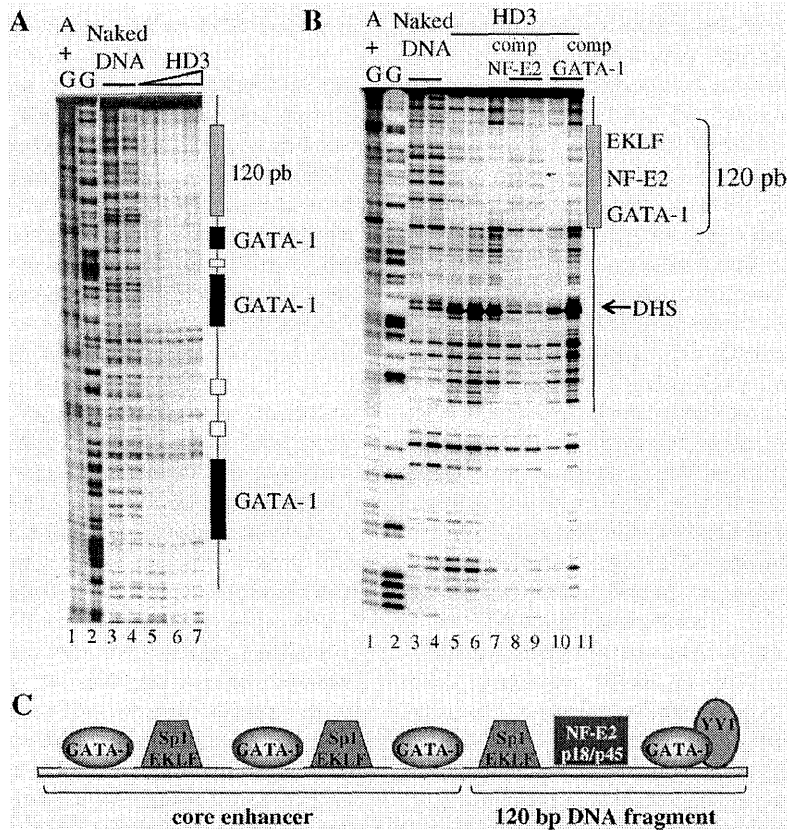


Fig. 2. *In vitro* DNase I footprinting and scheme of the DNA-protein interactions over the 3' chicken  $\alpha$ -globin enhancer. (A) *Hin*P1I–*Hin*I (285 bp) DNA fragment containing the full enhancer was radioactive labeled, incubated with increasing concentrations of chicken HD3 cells nuclear extracts and *in vitro* digested with DNase I nuclease. Several footprints are seen in addition to the corresponding GATA-1 protected sequences. In particular, several GGTGG sequences and two Sp1-like motifs are also protected (open boxes). Notice a large footprinted area initiating after the third GATA-1 motif that includes the 120 bp DNA fragment. (B) Characterization of DNA–protein interactions over the 120 bp DNA fragment with a large footprint of around 60 bp (see lanes 5, 6 and 10). We carried out competitions with known sequences that bind NF-E2 from the human porphobilinogen deaminase erythroid promoter and GATA-1 from the chicken  $\beta$ -globin enhancer. Notice the formation of an intense DHS, 40 bp downstream of the protected area. When competing with two concentrations of cold NF-E2 binding sequence, we observe the re-appearance of a band located just in the middle of the NF-E2 recognition sequence with the 120 bp DNA fragment (see small arrow on lanes 8 and 9). Interestingly, this competition causes the loss of the DHS DNA conformation that creates a strong DHS. For GATA-1 competition we observe the re-appearance of the majority of the bands seen in the naked DNA digestion (see lanes 10 and 11). (C) Summary of the defined nuclear factor interactions to the chicken  $\alpha$ -globin 3'-side enhancer.

over the region predicts a differential action of erythroid and non-erythroid transcription factors influenced by polypeptide concentrations, competition for DNA binding motifs and chromatin remodeling activities.

Another regulatory component that recurrently appears in the globin loci is the locus control region or LCR that in conjunction with enhancers and promoters participates in specific gene expression switching (Dean, 2006). LCRs were initially defined as long-distance regulatory elements composed by a set of DNase I hypersensitive sites that influence gene expression and perform a dominant and tissue-specific chromatin opening activity at a genomic domain scale (Bulger and Groudine, 1999; Dean, 2006). From the functional point of view an LCR can be described as a regulatory element that positively drives the expression of a linked transgene dependently on the copy-number and genomic integration site (Grosveld et al., 1987). Among several mechanistic models, recent investigations demonstrated that the  $\beta$ -globin LCR is actively involved in chromosomal loop formation (Bulger and Groudine, 1999;

Chakalova et al., 2005; West and Fraser, 2005). Groudine and collaborators showed that the LCR seems to participate in domain relocation, which favors transcriptional activation through placing the domain in an active transcription factory inside of the nucleus (Chakalova et al., 2005; Ragozy et al., 2006). Therefore, the LCR seems to play a topological role on tissue-specific genomic domain formation, suggesting its involvement in a domain scale regulatory hierarchy fine-tuning the activities of enhancers and promoters, leading to gene activation or repression.

In comparison with other globin domains, including the chicken  $\beta$ -globin locus, no locus control region (LCR) has been identified in the chicken  $\alpha$ -globin domain (Dean, 2006). At this point, the possibility of the presence of an LCR or other enhancer(s) cannot be discarded. Their existence is under investigation and we have found a novel group of DHS, with apparent erythroid specificity, on the non-coding 3'-side of the domain (Fig. 1). On the other side, a chromatin transition was found by Higgs and collaborators around 20 kb upstream of the

embryonic  $\pi$  gene, where the presence of an LCR had been theoretically predicted (Anguita et al., 2001).

Much less is known about the molecular features of the chicken 3'  $\alpha$ -globin silencer. What we have found until now is that the silencer is located side-by-side to the enhancer and that such location may give particular regulatory properties to both elements. We believe that their activity might be interconnected by means of their chromatin organization. We know that at least *in vitro* three unidentified nuclear factors interact with the silencer element (Recillas Targa et al., 1993). Then, we hypothesize that the silencer could be functional during primitive differentiation events or at some developmental stage when  $\alpha$ -globin genes need to be differentially silenced (see below).

To better understand the function of this dual regulatory element, we have systematically characterized its local chromatin structure. Briefly, micrococcal nuclease and restriction enzyme accessibility experiments suggested that the chromatin at the silencer, where two nucleosomes are positioned, presents an open conformation in early stages of development, and becomes progressively "closed" as development progresses (Escamilla-Del-Arenal and Recillas-Targa, in preparation). Several possible scenarios arise from these results; the silencer could directly interfere with the embryonic gene promoter function *in vivo* or it acts over the enhancer controlling its regulatory functions. Alternatively, the so-called "silencer" may be part of the enhancer and collaborate with its activity in certain circumstances. In conclusion the enhancer and silencer could establish complex functional interactions, with potential implications in chromatin structure and differential gene expression of the  $\alpha$ -globin domain, which still wait to be unraveled.

Over the years the globin gene domains in distinct organisms have demonstrated to be a source of new data that founded novel and unsuspected concepts. Of particular interest is the existence of intergenic transcripts called by Scherrer "giant" or "Full domain transcripts" that correspond to long pre-mRNA that include non-coding and coding sequences (for review Scherrer, 2003). Long time ignored, non-coding transcripts were suggested to contribute to loop formation at a domain scale with a primary topological role that derives in the protection, storage and stability of transcripts, besides processing of those long pre-mRNA's (Scherrer, 2003). Such pioneer vision initiated in the 60s was more recently supported by novel proposals for their functions (Ashe et al., 1997; Gribnau et al., 2000; Razin et al., 2004; Haussecker and Proudfoot, 2005). Today, globin intergenic transcripts are thought to facilitate the sub-domain chromatin opening at globin loci (Gribnau et al., 2000) or mediate RNAi-dependent chromatin silencing at a domain scale (Haussecker and Proudfoot, 2005).

Another aspect of the  $\alpha$ -globin domain that we have been concerned lately in collaboration with Sergey Razin, that seems to be related to the presence of intergenic transcripts, is the identification of a silencer element co-localizing with a CpG-island situated in the 5' non-coding region of the chicken  $\alpha$ -globin domain (Fig. 1; Klochkov et al., 2006). Such silencer is CTCF-dependent and based on several evidences, we propose that this novel regulatory element may regulate the expression of *ggPRX*

housekeeping gene, which begins around 4 kb upstream of the embryonic  $\pi$  gene and is transcribed on the opposite direction of the globin genes. The sequence analyzed corresponds to a CpG-island contacted by CTCF in erythroid cells but not in chicken lymphoid cells, where CTCF binding site and surrounding sequence is hypermethylated (Fig. 3; Klochkov et al., 2006).

At this point a possible model is that the silencer element is active only in erythroid cells where the CTCF recognition site is not methylated, in contrast to lymphoid and non-erythroid cells (Fig. 3). Activation of the silencer in erythroid cells is likely to miss-regulate *ggPRX* gene transcription leading to a situation in which the promoter of this gene may be influenced by the putative upstream LCR, which is needed to activate the  $\alpha$ -globin genes and regulate domain chromatin conformation (Fig. 3). In non-erythroid cells hypermethylation of the area adjacent to the *ggPRX* gene promoter could induce the inactivation of CTCF blocking activity in addition to the inactivation of globin *cis*-regulatory elements allowing full expression of the *ggPRX* gene (Fig. 3). Alternatively, we do not discard the possibility that *ggPRX* transcript participates in some way in the establishment of domain chromatin structure.

What seems very attractive is the fact that upstream non-coding sequences of the chicken  $\alpha$ -globin domain contain intergenic transcripts (Gribnau et al., 2000; Andersen and Panning, 2003; Razin et al., 2004; Bernstein and Allis, 2005). Preliminary data from our group suggest that in distinct stages of development double-stranded non-coding RNAs are synthesized. If such transcripts contribute not only to gene expression regulation but also to chromatin domain organization through regulated recruitment of chromatin remodeling activities is currently under investigation (Gribnau et al., 2000; Haussecker and Proudfoot, 2005). Interestingly, two recent publications support the role of Polycomb and Trithorax protein family

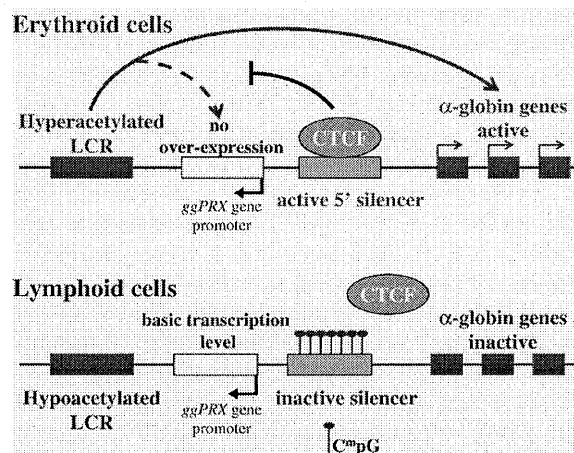


Fig. 3. Model for action of the chicken  $\alpha$ -globin gene 5' silencer. On erythroid cells, CTCF is able to bind *in vivo* to the *ggPRX* gene promoter upstream element (Klochkov et al., 2006), located around 4 kb upstream of the embryonic  $\pi$  gene. The silencer would attenuate or bypass the action of the LCR over the *ggPRX* gene allowing LCR specific regulation of  $\alpha$ -globin genes. In non-erythroid cells, hypermethylation and changes in chromatin conformation will allow normal *ggPRX* gene expression.

members in the establishment of close or open, respectively, chromatin conformations through non-coding RNA intermediates (Sanchez-Elsner et al., 2006; Grimaud et al., 2006).

In summary, the  $\alpha$ -globin locus is apparently much more complex in terms of its differential gene regulation than previously anticipated. Moreover, there are elements that are partially defined and their *in vivo* contributions remain to be elucidated.

#### 4. The chicken $\beta$ -globin domain and regulatory components

As mentioned, the chicken  $\beta$ -globin group of genes is located in the chromosome 1, and contains one embryonic  $\epsilon$  gene and a fetal  $\rho$  gene that are expressed in primitive erythroid lineages (Fig. 4). In definitive erythroid cells two adult genes,  $\beta^A$  and  $\beta^H$  are differentially expressed during development. The  $\beta$ -globin locus possess two main regulatory elements: the  $\beta^A/\epsilon$  enhancer, located between the adult  $\beta^A$  gene and the  $\epsilon$  embryonic gene promoter, and the upstream LCR composed by three erythroid specific DHS (Fig. 4). Even though individually each element has been extensively characterized, the overall participation of these elements in the  $\beta$ -globin expression regulation during development and erythroid differentiation remains unclear. The  $\beta^A/\epsilon$  enhancer was one of the first regulatory elements demonstrated to activate one gene over another by promoter access competition (Foley and Engel, 1992). Competition between stage-specific transcription factors for promoter elements dictates the developmental activation of the adult  $\beta^A$  or the embryonic  $\epsilon$  gene through enhancer action, since this element is located at an equivalent distance between both

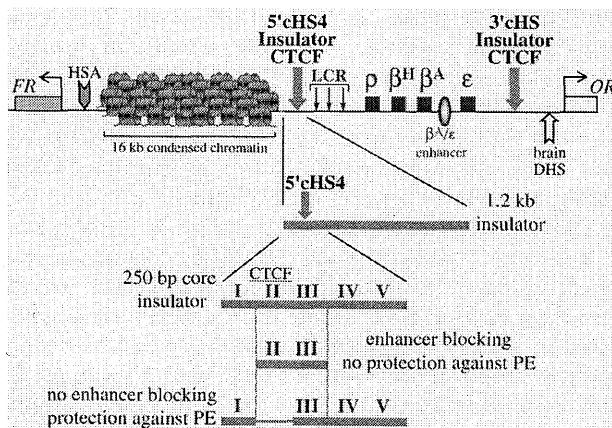


Fig. 4. The chicken  $\beta$ -globin domain and neighbor genomic loci. An erythroid-specific LCR and the strong  $\beta^A/\epsilon$  enhancer are responsible for regulation of the  $\beta$ -globin domain. Domain boundaries (insulators 5'cHS4 and 3'cHS) as well as *in vitro* and *in vivo* CTCF association sites have been determined. The 5'cHS4 constitutive DHS has insulator properties, a CTCF-dependent enhancer-blocking activity, and protects a transgene against position effects and silencing. Five protein-binding sites (I to V) are schematically represented under the map of the locus. Experiments demonstrated that the two cHS4 properties are separable. The constitutive 3'cHS site also binds CTCF but has only enhancer-blocking activity. The neighbor genomic loci are composed by 16 kb of highly condensed chromatin followed by an erythroid specific folate receptor gene (*FR*) apparently regulated by a DHS named HSA. On the 3'-side, a brain specific olfactory receptor gene (*OR*) constitute the next domain.

genes (Foley and Engel, 1992). In addition the  $\beta^A/\epsilon$  enhancer and the upstream chicken  $\beta$ -globin LCR drive copy-number-dependent expression of a reporter gene in transgenic mice (Reitman et al., 1990).

As mentioned before the  $\beta$ -globin LCR, containing well-characterized DHS, in collaboration with the  $\beta^A/\epsilon$  enhancer is able to drive position-independent gene expression in transgenic mice (Reitman et al., 1990; Abruzzo and Reitman, 1994; Mason et al., 1995). Individually, cHS2 and cHS3 showed significant enhancer activity while cHS1 did not. In particular, cHS2 has been studied in detail and it has been demonstrated that its activity mainly depends on GATA-1, with an apparent contribution of Sp1 and the erythroid EKLf factor (Abruzzo and Reitman, 1994). Functional experiments showed that individually or in conjunction with the other regulatory element fragments, the 5' DHS drive different enhancer and position-independent expression patterns when tested in transgenic mice (Mason et al., 1995). When the entire locus is analyzed, the copy number-dependent expression is maintained with an additional 6-fold increase in expression (Mason et al., 1995). Interestingly, transgenic mice carrying the entire chicken  $\beta$ -globin domain express the globin genes with the proper chicken developmental program.

All this experimental evidence supports the functionality of the chicken  $\beta$ -globin domain LCR element, which requires coordinated action of the four upstream hypersensitive sites and the  $\beta^A/\epsilon$  enhancer. At the 3'-side of the  $\beta$ -globin domain there is no evidence of the existence of a regulatory element equivalent to the 3'-side  $\alpha$ -globin silencer–enhancer, demonstrating a clear difference between both globin domains that are located in distinct chromosomes of the chicken genome. On the other hand, the presence of an LCR in the  $\alpha$ -globin locus remains as an unsolved question.

Epigenetic globin regulation involves DNA methylation. DNA methylation has been demonstrated to occur in avian  $\alpha$ -globin gene promoters during development (Singal et al., 2002a,b). In particular, the chicken embryonic  $\pi$  gene promoter *de novo* methylation correlates with gene silencing at 8 days of development (Singal et al., 2002b). In other words, in 5 days old chicken embryos the embryonic  $\pi$  gene is active and hypomethylated. Embryonic gene promoter methylation is consistent with the association of methyl-CpG-binding proteins and histone deacetylation in 11 days old erythrocytes where the embryonic gene is already silenced (Singal et al., 2002b). These results suggested us that sequential and coordinated epigenetic mechanisms should normally be activated for the so-called autonomous silencing of the embryonic  $\alpha$ -globin  $\pi$  gene that is followed by adult gene expression (Raich et al., 1990). We speculate that the initial step towards  $\pi$  gene silencing could involve the dissociation of the transcription factors regulating the promoter, like GATA-1 and Sp1, and/or the incorporation of a nuclear factor recruiting co-repressors. Those co-repressors would attract chromatin remodelers like histone deacetylases and methylases or even DNA methylation activities. We propose DNA methylation as the last epigenetic repressive component to create the autonomous and in some way irreversible, silencing of  $\pi$  gene when its expression is anymore needed

during development. Addressing these possibilities in detail is in need since the generated knowledge could be extrapolated to for example early epigenetic programming of stem cells and epigenetic miss-regulation of tumour suppressor genes or oncogenes in cancer (see below).

### 5. The chicken $\alpha$ -globin gene domain and its chromatin organization

If we compare the chicken  $\alpha$ -globin with the  $\beta$ -globin domain, the first aspect to be mentioned is that the  $\alpha$ -globin domain in chicken and other organisms is situated in a genomic region of constitutive open chromatin configuration (Recillas-Targa, 2000; Flint et al., 2001; Razin et al., 2003; Higgs et al., 2005). Based on the presence of all the regulatory elements described and the presence of intergenic transcripts (not characterized at the  $\beta$ -globin cluster) it is not surprising that the  $\alpha$ -globin domain is situated in a more relaxed chromatin environment in comparison to the  $\beta$ -globin domain, which is clearly shielded and its chromatin structure modulated (see below). In addition to the presence of non-globin genes over the domain, the mouse and human  $\alpha$ -globin locus are located in relative close proximity to telomeres (Flint et al., 2001; Higgs et al., 2005). All this evidences support the need of a constitutively open chromatin conformation in the  $\alpha$ -globin domain in order to counteract a possible silencing effect from the telomeres.

We have recently characterized a group of three DHS located 11 kb upstream the embryonic  $\pi$  gene in the  $\alpha$ -globin domain (Fig. 1). We have found that the two most distal DHS have characteristics of a chromatin insulator element (Valadez-Graham et al., 2004). The third hypersensitive site apparently corresponds to a silencer element. Interestingly, both elements named  $\alpha$ EHS-1.4 and  $\alpha$ CHS-1.2 possess enhancer-blocking activity and for the  $\alpha$ EHS-1.4 such activity is CTCF-dependent (Valadez-Graham et al., 2004). Furthermore, we have demonstrated *in vitro* and *in vivo* CTCF binding to the  $\alpha$ EHS-1.4 element (Valadez-Graham et al., 2004). We are now testing the second property of insulators, which is the capacity to protect a transgene against chromosomal position effects (Pikaart et al., 1998; Recillas-Targa et al., 2002, 2004), of these enhancer blockers. But the relevant question is if these elements represent some sort of domain boundary. Apparently this is not the case since Higgs and collaborators had found a sharp histone hyperacetylation transition around 6 kb further upstream from the CTCF binding site of the  $\alpha$ EHS-1.4 insulator (Fig. 1; Anguita et al., 2001). Then, at this point the role of these novel insulators in the regulation and chromatin structure of the chicken  $\alpha$ -globin gene domain it is not known. Two proposals arise that in first instance do not seem mutually exclusive. First, the enhancer blocking activities may contribute to intergenic transcripts regulation, avoiding undesired crossover among regulatory signals or blocking more upstream non-globin elements. CTCF, which is distributed all over the domain, could participate in topological organization through mediating differential loop formation as shown for the *Igf2/H19* imprinted loci (Reik et al., 2004; Chakalova et al., 2005). Such model is further supported

by CTCF multimerization capacity and interaction with the nuclear matrix components (Valadez-Graham et al., 2004; Yusufzai et al., 2004; Yusufzai and Felsenfeld, 2004).

Concerning the domain 3'-side chromatin structure, much less is known. We have recently identified three DHS downstream of the adult  $\alpha^A$  gene in proximity to the previously described CR1-repeats (Fig. 1; Farache et al., 1990). In addition, over that genomic region sequences associated to the nuclear matrix, topoisomerase binding consensus sequences and AT-rich DNA segments have also been found (Farache et al., 1990). We are currently interested in defining the functional properties of those sequences, post-translational histone modifications and whether those sequences correspond to the 3'-side boundary of the domain.

Thus, the  $\alpha$ -globin domain incorporates multiple elements related to chromatin structure regulation, which have not been integrated in a functional context. What seems most important is to address the relationship between domain chromatin architecture and developmental  $\alpha$ -globin gene expression. Such complex relationship may involve epigenetic silencing of embryonic or adult genes through at least histone deacetylases and DNA methylation.

### 6. The chicken $\beta$ -globin domain and its chromatin organization

Historically, Felsenfeld and collaborators invested many years of intense investigations leading to the establishment of the chicken  $\beta$ -globin locus as a paradigmatic model system (Burgess-Beusse et al., 2002). We previously mentioned the  $\beta$ -globin locus, containing three erythroid specific DHSs. In fact, there is a fourth DHS, known as cHS4, which is constitutive and clearly delineates the 5' boundary of the domain (Litt et al., 2001a). Interestingly, the 3'-side of the chicken  $\beta$ -globin locus is also defined by the presence of a 3'cHS DHS (Saitoh et al., 2000; Litt et al., 2001a). Such DHS distribution correlates with high levels of histone hyperacetylation, in particular in stages where the  $\beta$ -globin genes are expressed in erythroid cells (Litt et al., 2001a,b). However, the genomic sequence upstream of 5' cHS4 and downstream of the 3'cHS are marked by a drastic drop in DNase I sensitivity and the incorporation of histone repressive marks (Litt et al., 2001b). Moreover, the chromatin upstream of 5' cHS4 site remains in a constitutively condensed or heterochromatin configuration along 16 kb followed by an erythroid folate receptor gene as the next genomic domain (Fig. 4; Litt et al., 2001a; Burgess-Beusse et al., 2002). On the other side of the  $\beta$ -globin domain, downstream to the 3'cHS, an odorant receptor gene with an apparent brain specific gene expression pattern has been found, which constitutes the downstream neighboring genomic domain (Fig. 4; Saitoh et al., 2000). All together, these observations showed a well defined transition from open to a closed chromatin organization upstream and downstream of each constitutive DHS flanking the chicken  $\beta$ -globin domain, supporting the concept of genome organization into chromatin domains (Razin et al., 2003). Hence, these data strongly suggests that insulators and/or boundaries may be contributing to epigenome organization by



delimiting chromatin structure transition areas (Burgess-Beusse et al., 2002; West and Fraser, 2005).

Pioneer work from Felsenfeld research group defined the 5' boundary of the chicken  $\beta$ -globin locus as a 1.2 kb DNA fragment, which possess the two classical properties of insulators: 1) positional enhancer-blocking and 2) protection of a transgene against chromosomal position effects (Burgess-Beusse et al., 2002). Interestingly, both boundary elements (the 5' cHS4 and the 3'cHS), function as enhancer blockers in a CTCF-dependent manner (Burgess-Beusse et al., 2002). Concerning the second property of insulators, initially two copies of the 1.2 kb DNA fragment harboring the 5' cHS4 where shown to protect against chromosomal position effects in distinct cell types and organisms (Pikaart et al., 1998; Recillas-Targa et al., 2002, 2004). Further characterization demonstrated that the minimal element required corresponds to two copies of a 250 bp DNA fragment including five previously defined sequences named footprint FI to FIV, which are recognized by nuclear factors (Fig. 4; Recillas-Targa et al., 2002). Surprisingly, systematic deletion analysis demonstrated that CTCF is not required for protection against position effect activity by the 5' cHS4 insulator (Recillas-Targa et al., 2002). These observations suggest a cohabitation of the two insulator properties in the 5' cHS4 fragment. Further investigations from Felsenfeld group have defined with much more detail the features of the minimal core insulator element, and found that instead of being functionally bipartite, it corresponds to a tripartite insulator element. The chicken  $\beta$ -globin 5' cHS4 insulator is able to: 1) block enhancer promoter interaction in a CTCF-dependent manner, 2) protect a transgene against chromosomal position effect through the active recruitment of proteins favoring histone covalent modifications like histone acetylation and methylation (mediated by the following transcription factors: USF1/2, SET7/9, PRMT1, p300 and CBP) and 3) block epigenetic silencing by DNA methylation probably mediated by BGP factor (West et al., 2004; Huang et al., 2005; Felsenfeld personal communication).

Most recent investigations from our laboratory demonstrated that the core chicken 5' cHS4  $\beta$ -globin insulator is also able to protect a transgene against telomeric position effects. Such a result supports the protective role of the 5' cHS4 insulator even in the presence of one of the most dominant and strong source of epigenetic silencing, confirming the virtues of this insulator (Rincón-Arango and Recillas-Targa, in preparation).

On the other hand, the 3'cHS chromatin insulator is not able to protect a transgene against chromosomal position effects (Recillas-Targa et al., 2002). Therefore, the 3'cHS insulator maintains only one of the two insulator properties. Furthermore, there is a noticeable absence of the histone marks that constitutively seen at the 5' cHS4 insulator as shown by chromatin immunoprecipitation assays (Litt et al., 2001a). These observations suggest that protection against position effects depends on the genomic organization of the  $\beta$ -globin loci and neighbor domains (Fig. 3). Downstream of the 3' domain boundary, a condensed chromatin region equivalent to the 16 kb described at the 5'-side is absent. Moreover, the adjacent gene is expressed exclusively in brain (Felsenfeld personal communication). Thus, we can argue that in the case of the 3'cHS insulator

only enhancer-blocking activity (if there is any *in vivo*) is needed. In contrast, the 5'cHS4 boundary needs both activities, in particular the one desirable to stop a theoretical spreading of repressive chromatin (Fig. 4).

Therefore, specific chromatin modifications can be correlated with differentiation and developmental changes over the chicken  $\beta$ -globin locus and its neighboring genomic domains. The significance of the insulator elements surrounding the  $\beta$ -globin domain and their possible role in establishing and/or maintaining these specific chromatin modifications throughout the domain remain to be clarified.

## 7. Epigenetics and tumour suppressor gene promoters

The comparative view of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin gene clusters has been illustrated to confirm the relevance of epigenetic regulation during erythroid differentiation and development. Such aspects motivated us to explore some of the epigenetic regulatory phenomena that occur on tumour suppressor genes in normal and pathological conditions. In particular, our main interest is to understand how tumour suppressor gene promoters, commonly corresponding to CpG-islands, are in normal conditions protected against aberrant DNA methylation (Antequera, 2003; Herman and Baylin, 2003). One more time, a comparative approach was followed to analyze two distinct tumour suppressor gene promoters: the human *p53* and retinoblastoma (*Rb*) gene promoters. Retinoblastoma gene promoter represents a classical CpG-island with 27 CpGs in its core element (400 bp). In contrast, the human *p53* gene promoter only has 16 CpGs and strictly should not be considered as a CpG-island. Previous observations from our group and others clearly demonstrated that both promoters can be inactivated by epigenetic mechanisms (Ohtani-Fujita et al., 1997; Stirzaker et al., 1997; Aguirre et al., 2003; Sidhu et al., 2005). In our laboratory we have recently demonstrated that in normal conditions *p53* gene expression is maintained in basal levels through epigenetic mechanisms involving the establishment of repressive, and apparently reversible, chromatin marks upon *p53* transcription is needed. In the case of *Rb* gene promoter, we have discovered a novel transcriptional regulator, the 11-zinc finger multivalent CTCF factor (Ohlsson et al., 2001; Klenova and Ohlsson, 2005). We have found that CTCF contributes positively to the *Rb* gene expression regulation; moreover, preliminary data supports a protective role of CTCF against DNA methylation (Recillas-Targa et al., 2006). Thus, comparatively these two tumour suppressor gene promoters are regulated, in part, through epigenetic mechanisms in their normal context. In contrast, epigenetic defects have been evidenced with a growing frequency (Feinberg et al., 2006). Comparative studies turn out to be quite instructive since there is growing evidence showing that epigenetic defects participate in initial steps and during cancer development (Feinberg et al., 2006).

As an attractive view, Jean-Pierre Issa (2004) had recently proposed what he has called the "CpG-island methylator phenotype" to explain the origins of aberrant DNA methylation and epigenetic silencing of CpG-islands. Briefly, the "methylator phenotype" establishes a central concept in which DNA

methylation patterns should allow certain degree of tumour classification according to expression of genes affected by DNA methylation. In terms of possible mechanisms, it has been suggested that DNA methylation spreading could initiate at “methylation centres” in non-coding regions encompassing large genomic areas including repetitive sequences and in the worst scenario, invading regulatory elements, like tumour suppressor gene promoters (Herman and Baylin, 2003; Issa, 2004). Furthermore, Issa proposed that boundary elements might be present delimiting CpG-islands, protecting them against DNA methylation. In fact, such hypothetical boundary may not be designed exclusively against DNA methylation, but rather could contribute to protect against other abnormal repressive epigenetic modifications like histone deacetylation, or activities displayed by chromatin remodeling complexes or members of the Polycomb family of proteins (Lund and van Lohuizen, 2004). It can be thought that DNA methylation could, not exclusively, stand as one of the latest in the series of events leading to epigenetic silencing (Mutskov et al., 2002). These arguments allow us to insist that DNA methylation is one but not the only source of epigenetic silencing, supporting the multiple levels of epigenetic influence, interdependency and complexity operating during anomalous gene regulation in diseases.

Our findings bear the model in which CTCF can have two main roles in the regulation of tumour suppressor gene promoters (Klenova et al., 2002; Klenova and Ohlsson, 2005). The proposal is a topological function of CTCF on those promoters through their association to the nuclear matrix and a protective role of CpG-islands against DNA methylation and maybe other epigenetic modifications (Recillas-Targa et al., 2006). Then, the possibility of the existence of a novel class of transcription factors is now open, with bivalent or even multivalent properties, with the ability to regulate (in different and versatile ways) epigenetic processes.

## 8. Conclusions and prospects

Comparative studies have provided unexpected amount of biological information at all levels. Here we have presented a comparative analysis of the chicken  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin group of genes from the regulatory and chromatin structure perspective. We have also attempted to present in a logical way the relevant findings from our group and other laboratories. We conclude that, even though the highly precise requirements of  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin peptide chains for hemoglobin formation, both genomic loci are found in distinct chromosomes and uniquely regulate differential gene expression; accordingly, their domain organization and chromatin structure differs. The  $\beta$ -globin domain is clearly defined and shielded by chromatin boundaries or insulators. In contrast, the  $\alpha$ -globin locus presents a more complex chromatin organization, with no LCR and clear boundaries defined yet, besides intergenic transcripts with no-clear function. All these observations motivated us to raise some questions about the participation of distinct epigenetic processes, like silencing of tumour suppressor gene promoters in human diseases. We propose that a novel kind of transcription factors may contribute

to maintain a CpG-island in a state that avoids abnormal gene expression silencing. The relevance of these phenomena is based on the fact that such scenario turns to be present more commonly in cancer than previously anticipated (Feinberg et al., 2006; Baylin and Ohm, 2006).

New data concerning the eukaryotic epigenome supports the domain hypothesis for genome organization (Razin et al., 2003). Cell nucleus and sub-nuclear compartments, chromatin remodeling processes and genome domain organization are complementary and interdependent phenomena affecting the epigenome leading to a regulated expression of a multifamily gene domain like the globin genes.

Epigenome topology and nuclear dynamics seem to be relevant aspects on epigenetic regulation. This is supported by data showing that inter- and intrachromosomal physical association through loop formation seems to occur with consequences in gene expression coordination (Chakalova et al., 2005; Ling et al., 2006; Kurukuti et al., 2006; Esteller, 2006). This observation supports the concept of three-dimensional chromosomal territories organization of the epigenome in inter-phase nuclei (Cremer and Cremer, 2001; Chakalova et al., 2005) and that chromosomal domains should be coordinated to attract or dissociate genomic domains to active transcription nuclear factories inside the nucleus. One of the most attractive challenges is the need to integrate all these phenomena in a rational way trying to define hierarchies among each process taking into consideration the design of potential therapeutic strategies for treatment of distinct malignancies.

## Acknowledgments

We thank Miriam Rosenberg for critical reading of the manuscript. We would like to acknowledge the two anonymous reviewers for their helpful comments and suggestions. This work was supported by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (IN203200, IX230104 and IN209403), the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT (33863-N and 42653-Q), the Third World Academy of Sciences (TWAS, Grant 01-055 RG/BIO/LA), and Fundación Miguel Alemán, A.C. ME-D-A, MF-M, ER, IADLR-V, ES-R, HR-A and CV-Q are fellowship recipients from CONACyT.

## References

- Abruzzo, L.V., Reitman, M., 1994. Enhancer activity of upstream hypersensitive site 2 of the chicken  $\beta$ -globin cluster is mediated by GATA sites. *J. Biol. Chem.* 269, 32563–32571.
- Aguirre, X., Vizmanos, J.L., Calasanz, M.J., Garcia-Delgado, M., Larrayoz, M.J., Novo, F.J., 2003. Methylation of CpG dinucleotides and/or CCWGG motifs at the promoter of TP53 correlates with decreased gene expression in a subset of acute lymphoblastic leukemia patients. *Oncogene* 22, 1070–1072.
- Andrews, N.C., Erdjument-Bromage, H., Davidson, M.B., Tempst, P., Orkin, S.H., 1993. Erythroid transcription factor NF-E2 is a haematopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature* 362, 722–728.
- Andersen, A.A., Panning, B., 2003. Epigenetic gene regulation by noncoding RNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 281–289.
- Anguita, E., Johnson, C.A., Wood, W.G., Turner, B.M., Higgs, D.R., 2001. Identification of a conserved erythroid specific domain of histone acetylation

- across the  $\alpha$ -globin gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12114–12119.
- Antequera, F., 2003. Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1647–1658.
- Ashe, H.L., Monks, J., Wijgerde, M., Fraser, P., Proudfoot, N.J., 1997. Intergenic transcription and transinduction of the human  $\beta$ -globin locus. *Genes Dev.* 11, 2494–2509.
- Baylin, S.B., Ohm, J.E., 2006. Epigenetic gene silencing in cancer— a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat. Rev., Cancer* 6, 107–116.
- Bernstein, E., Allis, C.D., 2005. RNA meets chromatin. *Genes Dev.* 19, 1635–1655.
- Boyes, J., Byfield, P., Nakatani, Y., Vasily, O., 1998. Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature* 396, 594–598.
- Bulger, M., Groudine, M., 1999. Looping versus linking: toward a model for long-distance gene activation. *Genes Dev.* 13, 2465–2477.
- Burgess-Beusse, B., Farrell, C., Gaszner, M., Litt, M., Mutskov, V., Recillas-Targa, F., Simpson, M., West, A., Felsenfeld, G., 2002. The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (suppl. 4), 16433–16437.
- Cantor, A.B., Orkin, S.H., 2005. Coregulation of GATA factors by the friend of GATA (FOG) family of multiple zinc finger proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 117–128.
- Chakalova, L., Debrand, E., Mitchell, J.A., Osborne, C.S., Fraser, P., 2005. Replication and transcription: shaping the landscape of the genome. *Nat. Rev., Genet.* 6, 669–677.
- Chervenak, A.P., Basu, P., Shin, M., Redmond, L.C., Sheng, G., Lloyd, J.A., 2006. Identification, characterization and expression pattern of the chicken EKLf gene. *Dev. Dyn.* 235, 1933–1940.
- Cremer, T., Cremer, C., 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev., Genet.* 2, 292–301.
- Dean, A., 2006. On a chromosome far, far away: LCRs and gene expression. *Trends Genet.* 22, 38–45.
- Escamilla-Del-Arenal, M., Recillas-Targa, F., in preparation. Characterization of the chromatin structure of the silencer-enhancer elements of the chicken alpha-globin gene domain.
- Esteller, M., 2006. The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis* 27, 1121–1125.
- Farache, G., Razin, S.V., Recillas Targa, F., Scherrer, K., 1990. Organization of the 3' boundary of the chicken  $\alpha$ -globin gene domain and characterization of a CR1-specific protein binding site. *Nucleic Acids Res.* 18, 401–409.
- Feinberg, A.P., Ohlsson, R., Henikoff, S., 2006. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat. Rev., Genet.* 7, 21–33.
- Flint, J., Tufarelli, C., Peden, J., Clark, K., Daniels, R.J., Hardisson, R., Miller, W., Philipson, S., Tan-Un, K.C., McMarrow, T., Frampton, J., Alter, B.P., Frischauf, A.M., Higgs, D.R., 2001. Comparative genome analysis delimits a chromosomal domain and identifies key regulatory elements in the  $\alpha$ -globin cluster. *Hum. Mol. Genet.* 10, 371–382.
- Foley, K.P., Engel, J.D., 1992. Individual stage selector element mutations lead to reciprocal changes in  $\beta$ - vs  $\epsilon$ -globin gene transcription: genetic confirmation of promoter competition during globin gene switching. *Genes Dev.* 6, 730–744.
- Francastel, C., Magis, W., Groudine, M., 2001. Nuclear relocation of a transactivator subunit precedes target gene activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12120–12125.
- Gribnau, G., Diderich, K., Pruzina, S., Calzolari, R., Fraser, P., 2000. Intergenic transcription and development remodeling of chromatin subdomains in the human  $\beta$ -globin locus. *Mol. Cell* 5, 377–386.
- Grimaud, C., Bantignies, F., Pal-Bhadra, M., Chana, P., Bhadra, U., Cavalli, G., 2006. RNAi components are required for nuclear clustering of Polycomb group response elements. *Cell* 124, 957–971.
- Grosfeld, F., van Assendelf, G.B., Graves, D.R., Kollias, G., 1987. Position-independent, high-level expression of the human  $\beta$ -globin gene in transgenic mice. *Cell* 51, 975–985.
- Haussecker, D., Proudfoot, N.J., 2005. Dicer-dependent turnover of intergenic transcripts from the human  $\beta$ -globin gene cluster. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9724–9733.
- Herman, J.G., Baylin, S.B., 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* 349, 2042–2054.
- Higgs, D.R., Garrick, D., Anguita, E., DeGobbi, M., Hughes, J., Muers, M., Vernimmen, D., Lower, K., Lae, M., Argentaro, A., Deville, M.A., Gibbons, R., 2005. Understanding  $\alpha$ -globin gene regulation: aiming to improve the management of thalassemia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1054, 92–102.
- Hong, W., Nakazawa, M., Chen, Y.Y., Kori, R., Vakoc, C.R., Rakowski, C., Blobel, G.A., 2005. FOG-1 recruits the NuRD repressor complex to mediate transcriptional repression by GATA-1. *EMBO J.* 24, 2367–2378.
- Huang, S., Litt, M., Felsenfeld, G., 2005. Methylation of histone H4 by arginine methyltransferase PRMT1 is essential *in vivo* for many subsequent histone modifications. *Genes Dev.* 19, 1885–1893.
- Huo, X., Zhang, J., 2005. Important roles of reversible acetylation in the function of hematopoietic transcription factors. *J. Cell. Mol. Med.* 9, 103–112.
- Issa, J.-P., 2004. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat. Rev., Cancer* 4, 988–993.
- Johnson, K.D., Christensen, H.M., Zhao, B., Bresnick, E.H., 2001. Distinct mechanisms control RNA polymerase II recruitment to a tissue-specific locus control region and a downstream promoter. *Mol. Cell* 8, 465–471.
- Klenova, E.M., Ohlsson, R., 2005. Poly(ADP-ribosylation) and epigenetics. Is CTCF part of the plot? *Cell Cycle* 4, 96–101.
- Klenova, E.M., Morse III, H.C., Ohlsson, R., Lobanenko, V.V., 2002. The novel *BORIS+CTCF* gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin. Cancer Biol.* 12, 399–414.
- Klochov, D., Rincón-Arango, H., Ioudinkova, E.S., Valadez-Graham, V., Gavrillo, A., Recillas-Targa, F., Razin, S.V., 2006. A CTCF-dependent silencer located in the differentially methylated area may regulate expression of a housekeeping gene overlapping a tissue-specific gene domain. *Mol. Cell. Biol.* 26, 1589–1597.
- Kosak, S.T., Groudine, M., 2004. Form follows function: the genomic organization of cellular differentiation. *Genes Dev.* 18, 1371–1384.
- Kurukuti, S., Tiwari, V.K., Tavoosidama, G., Pugacheva, E., Murrell, A., Zhao, Z., Lobanenko, V., Reik, W., Ohlsson, R., 2006. CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to *Igf2*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10684–10689.
- Liew, C.W., Rand, K.D., Simpson, R.J., Ung, W.W., Mansfield, R.E., Crossley, M., Proetorius-Ibba, M., Nerlov, C., Poulsen, F.M., Mackay, J.P., 2006. Molecular analysis of the interaction between the hematopoietic master transcription factors GATA-1 and PU.1. *J. Biol. Chem.* 281, 28296–28306.
- Ling, J.Q., Li, T., Hu, J.F., Vu, T.H., Chen, H.L., Qui, X.W., Cherry, A.M., Hoffman, A.R., 2006. CTCF mediates interchromosomal colocalization between *Igf2/H19* and *Wsb1/Nf1*. *Science* 312, 269–272.
- Litt, M.D., Simpson, M., Recillas-Targa, F., Prioleau, M.N., Felsenfeld, G., 2001a. Transitions in histone acetylation reveal boundaries of three separately regulated neighboring loci. *EMBO J.* 20, 2224–2235.
- Litt, M.D., Simpson, M., Gaszner, M., Allis, C.D., Felsenfeld, G., 2001b. Correlation between histone lysine methylation and developmental changes at the chicken  $\beta$ -globin locus. *Science* 293, 2453–2455.
- Lund, A.H., van Lohuizen, M., 2004. Epigenetics and cancer. *Genes Dev.* 18, 2315–2335.
- Mason, M.M., Lee, E., Westphal, H., Reitman, M., 1995. Expression of the chicken  $\beta$ -globin gene cluster in mice: correct developmental expression and distribution control. *Mol. Cell. Biol.* 15, 407–414.
- Mutskov, V.J., Farrell, C.M., Wade, P.A., Wolffe, A.P., Felsenfeld, G., 2002. The barrier function of an insulator couples high histone acetylation levels with specific protection of promoter DNA from methylation. *Genes Dev.* 16, 1540–1554.
- Ohlsson, R., Reinkawitz, R., Lobanenko, V., 2001. CTCF is uniquely versatile transcription regulator linker to epigenetics and diseases. *Trends Genet.* 17, 520–527.
- Ohtani-Fujita, N., Drvja, T.P., Rapaport, J.M., Fujita, T., Matsumura, S., Ozasa, K., Watanabe, Y., Hayashi, K., Maeda, K., et al., 1997. Hypermethylation in the retinoblastoma gene is associated with unilateral, sporadic retinoblastoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 98, 43–49.
- Pikaart, M.J., Recillas-Targa, F., Felsenfeld, G., 1998. Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev.* 12, 2852–2862.
- Ragoczy, T., Bender, M.A., Telling, A., Byron, R., Groudine, M., 2006. The locus control region is required for association of the murine  $\beta$ -globin locus

- with engaged transcription factories during erythroid maturation. *Genes Dev.* 20, 1447–1456.
- Raich, N., Enver, T., Nakamoto, B., Josephson, B., Papayannopoulou, T., Stamatoyanopoulos, G., 1990. Autonomous developmental control of human embryonic globin gene switching and transgenic mice. *Science* 250, 1147–1149.
- Razin, S.V., Farrell, C.M., Recillas-Targa, F., 2003. Genomic domains and regulatory elements operating at the domain level. *Int. Rev. Cyt.* 226, 63–125.
- Razin, S.V., Rynditch, A., Borunova, V., Ioudinkova, E., Smalko, V., Scherrer, K., 2004. The 33 kb transcript of the chicken  $\alpha$ -globin gene domain is part of the nuclear matrix. *J. Cell. Biochem.* 92, 445–457.
- Recillas-Targa, F., 2000. The chicken  $\alpha$ - and  $\beta$ -globin gene domains and their chromatin organization. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 5, 451–467.
- Recillas-Targa, F., Razin, S.V., 2001. Chromatin domains and regulation of gene expression: familiar and enigmatic clusters of chicken globin genes. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 11, 227–242.
- Recillas Targa, F., De Moura Gallo, C.V., Huesca, M., Scherrer, K., Marcaud, L., 1993. Silencer and enhancer elements located at the 3'-side of the chicken and duck  $\alpha$ -globin-encoding gene domains. *Gene* 129, 229–237.
- Recillas-Targa, F., Pikaart, M.J., Burgess-Beusse, B., Bell, A.C., Litt, M.D., West, A.G., Gaszner, M., Felsenfeld, G., 2002. Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken  $\beta$ -globin insulator are separable activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6883–6888.
- Recillas-Targa, F., Valadez-Graham, V., Farrell, C.M., 2004. Prospects and implications of using chromatin insulators in gene therapy and transgenesis. *BioEssays* 26, 796–807.
- Recillas-Targa, F., De La Rosa-Velázquez, I.A., Soto-Reyes, E., Benítez-Bribiesca, L., 2006. Epigenetic boundaries of tumour suppressor gene promoters: the CTCF connection. *J. Cell. Mol. Med.* 10, 552–566.
- Reik, W., Murrell, A., Lewis, A., Mitsuya, K., Umlauf, D., Dean, W., Higgins, M., Fiel, R., 2004. Chromosome loops, insulators and histone methylation: new insights into regulation of imprinting in clusters. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* LXIX, 29–37.
- Reitman, M., Felsenfeld, G., 1988. Mutational analysis of the chicken  $\beta$ -globin enhancer reveals two positive-acting domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 6267–6271.
- Reitman, M., Lee, E., Westphal, H., Felsenfeld, G., 1990. Site-independent expression of the chicken  $\beta^A$ -globin gene in transgenic mice. *Nature* 348, 749–752.
- Rincón-Arano, H., Valadez-Graham, V., Guerrero, G., Escamilla-Del-Arenal, M., Recillas-Targa, F., 2005. YY1 and GATA-1 interaction modulate the chicken 3'-side  $\alpha$ -globin enhancer activity. *J. Mol. Biol.* 349, 961–975.
- Rincón-Arano, H., Recillas-Targa, F. in preparation. Protection against telomeric position effects by the chicken 5' cHS4 beta-globin insulator.
- Saitoh, N., Bell, A.C., Recillas-Targa, F., West, A.G., Simpson, M., Pikaart, M., Felsenfeld, G., 2000. Structural and functional conservation at the boundaries of the chicken  $\beta$ -globin domain. *EMBO J.* 19, 2315–2322.
- Sanchez-Elsner, T., Gou, D., Kremmer, E., Sauer, F., 2006. Noncoding RNAs of trithorax response elements recruit *Drosophila* Ash1 to ultrabithorax. *Science* 311, 1118–1123.
- Scherrer, K., 2003. Historical review: the discovery of 'giant' RNA and RNA processing: 40 years of enigma. *Trends Biochem. Sci.* 28, 566–571.
- Shyu, Y.-C., Lee, T.-L., Ting, C.-Y., Wen, S.-C., Hsieh, L.-J., Li, Y.-C., Hwang, J.-L., Lin, C.-C., Shen, C.-K.J., 2005. Sumoylation of p45NF-E2: nuclear positioning and transcriptional activation of the mammalian  $\beta$ -like globin gene locus. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10365–10378.
- Sidhu, S., Martin, R., Gicquel, C., Melki, J., Clark, S.J., Campbell, P., Magarey, C.J., Schulte, K.M., Roher, H.D., Delbridge, L., Robinson, B.G., 2005. Mutation and methylation analysis of TP53 in adrenal carcinogenesis. *Eur. J. Surg. Oncol.* 31, 549–554.
- Singal, R., Wang, S.Z., Sargent, T., Zhu, S.Z., Ginder, G.D., 2002a. Methylation of promoter proximal-transcribed sequences of an embryonic globin gene inhibits transcription in primary erythroid cells and promotes formation of a cell-type-specific methyl cytosine binding complex. *J. Biol. Chem.* 277, 1897–1905.
- Singal, R., vanWert, J.M., Ferdinand Jr., L., 2002b. Methylation of  $\alpha$ -type embryonic globin gene  $\alpha^T$  represses transcription in primary erythroid cells. *Blood* 100, 4217–4222.
- Stamatoyanopoulos, G., 2005. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Exp. Hematol.* 33, 259–271.
- Stirzaker, C., Millar, D.S., Paul, C.L., Wamecke, P.M., Harrison, J., Vincent, P.C., Frommer, M., Clark, S.J., 1997. Extensive DNA methylation spanning the Rb promoter in retinoblastoma tumors. *Cancer Res.* 57, 2229–2237.
- Stopka, T., Amanatullah, D.F., Papetti, M., Skoultschi, A.I., 2005. PU.1 inhibits the erythroid program by binding to GATA-1 on DNA and creating a repressive chromatin structure. *EMBO J.* 24, 3712–3723.
- Vakoc, C.R., Letting, D.L., Gheldof, N., Sawado, T., Bender, M.A., Groudine, M., Weiss, M.J., Dekker, J., Blobel, G.A., 2005. Proximity among distant regulatory elements at the  $\beta$ -globin locus requires GATA-1 and FOG-1. *Mol. Cell* 17, 453–462.
- Valadez-Graham, V., Razin, S.V., Recillas-Targa, F., 2004. CTCF-dependent enhancer blockers at the upstream region of the chicken  $\alpha$ -globin domain. *Nucleic Acids Res.* 32, 1354–1362.
- Wasserman, W.W., Sanderlin, A., 2004. Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nat. Rev., Genet.* 5, 276–287.
- West, A.G., Fraser, P., 2005. Remote control of gene transcription. *Hum. Mol. Genet.* 14, R101–R111.
- West, A.G., Huang, S., Gaszner, M., Litt, M.D., Felsenfeld, G., 2004. Recruitment of histone modifications by USF proteins at a vertebrate barrier element. *Mol. Cell* 16, 453–463.
- Yi, Z., Cohen-Barak, O., Hagiwara, N., Kingsley, P.D., Fuchs, D.A., Erickson, D.T., Epner, E.M., Palis, J., Brilliant, M.H., 2006. Sox6 directly silences epsilon globin expression in definitive erythropoiesis. *PLoS Genet.* 2, e14.
- Yusufzai, T.M., Felsenfeld, G., 2004. The 5'-HS4 chicken  $\beta$ -globin insulator in a CTCF-dependent nuclear matrix-associated element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8620–8624.
- Yusufzai, T.M., Tagami, H., Nakatani, Y., Felsenfeld, G., 2004. CTCF tethers an insulator to subnuclear sites, suggesting shared insulator mechanisms across species. *Mol. Cell* 13, 291–298.

**Dynamic changes of the nucleolar structure in absence of CTCF binding  
protein**

Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Genética Molecular, Universidad  
Nacional Autónoma de México, México D.F., México

\* Corresponding author: Félix Recillas-Targa  
Instituto de Fisiología Celular  
Departamento de Genética Molecular  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Apartado Postal 70-242  
México D.F. 04510  
México  
Phone: (52 55) 56 22 56 74  
FAX: (52 55) 56 22 56 30  
Email: [frecilla@ifc.unam.mx](mailto:frecilla@ifc.unam.mx)

Running Title: Dynamic changes of the nucleolar structure in absence of CTCF

Key words: Nucleolus; CTCF; Fibrillarin; AgNOR; Cancer; Nucleolar organizing region

**Differential silencing of human *p53* and *Rb* gene promoters by *in vitro* DNA  
methylation**

**Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Genética Molecular, Universidad Nacional  
Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, México D.F. 04510, México.**

Corresponding autor: Félix Recillas-Targa  
Instituto de Fisiología Celular  
Departamento de Genética Molecular  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Apartado Postal 70-242  
México D.F 04510  
MÉXICO  
Tel: (52-55) 56 22 56 74  
FAX: (52-55) 56 22 56 30  
Email: [frecilla@ifc.unam.mx](mailto:frecilla@ifc.unam.mx)  
<http://www.ifisiol.unam.mx/gmdepto.html>