



Universidad Nacional Autónoma de México



Instituto de Fisiología Celular

Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio del silenciamiento epigenético del gen humano Retinoblastoma vía la metilación del ADN en líneas celulares tumorales.

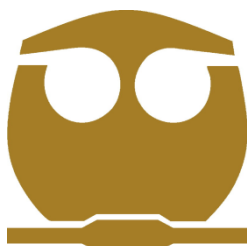
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:

Mercedes Imelda Dávalos Salas

Tutor: Dr. Félix Recillas Targa



MEXICO D.F.

Diciembre 2011



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.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Félix Recillas Targa en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular en la Universidad Nacional Autónoma de México.

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

Dr. Félix Recillas Targa	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Alejandro Zentella Dehesa	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Enrique A Reynaud Garza	Instituto de Biotecnología, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica de la Biol. Georgina Guerrero Avendaño durante la realización de diversos estudios y técnicas aplicadas en este trabajo.

Se reconoce a Gianelli Cortés González por su asistencia en el laboratorio.

Se reconoce la Colaboración de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, así como a la Unidad de Citometría del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (42653-Q, 58767 y 128464) y DGAPA-UNAM (IN209403, IN14407 y IN203811)

Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT (Número de becario 162257) para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 15 de diciembre del 2011.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Estela Sanchez Quintanar	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Alfonso León del Rio	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Secretario	Armando Tovar Palacio	Instituto Nacional de Nutrición
Suplente	Leticia Rocha Zavaleta	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Suplente	Tzvetanka Dimitrova Dinkova	Facultad de Química, UNAM

1. INTRODUCCIÓN.	5
1.1.Regulación de la expresión génica	5
1.2.La estructura de la cromatina	7
1.3.Regulación epigenética	10
1.3.1. Modificaciones post-traduccionales de histonas	11
1.3.2. Metilación del ADN	15
1.3.3. Complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP	23
1.3.4. Los ARNs no-codificantes y la regulación epigenética	26
1.3.4.1. Los ARNnc largos	27
1.3.4.2. Los ARNnc pequeños	31
1.3.5. Complejo represor Polycomb	32
1.3.5.1. Complejo de inicio del silenciamiento o complejo represor Polycomb 2 (PRC 2)	37
1.3.5.2. Complejo de mantenimiento o complejo represor Polycomb 1 (PRC1)	39
1.3.5.3. El mecanismo de acción de los complejos Polycomb	42
1.3.6. La organización y dinámica nuclear	46
1.4.El Cáncer: un enemigo silencioso	49
1.4.1. Oncogenes	53
1.4.2. Genes supresores de tumores	55
2. EPIGENÉTICA Y CÁNCER: ANTECEDENTES PARTICULARES	61
2.1.La proteína Retinoblastoma (pRb)	61
2.2.El gen <i>Retinoblastoma</i> humano	66
2.2.1. Regulación epigenética del gen <i>Rb</i>	67

2.2.1.1.	Antecedentes del Factor nuclear CTCF	68
2.2.1.2.	Metilación del ADN	70
2.2.1.3.	Participación de proteínas del grupo Polycomb	73
2.2.1.4.	Participación de Factores de la familia E2F	74
3.	PARTE 1: Estudio de la participación de E2F6, proteínas de la familia Polycomb y la metilación del ADN en la represión epigenética del gen <i>Retinoblastoma</i>	76
3.1.	Planteamiento del problema	76
3.2.	Justificación	76
3.3.	Hipótesis	77
3.4.	Objetivo general	77
3.4.1.	Objetivos particulares	77
3.5.	Resultados y Discusión	78
3.6.	Conclusiones	89
3.7.	Perspectivas	89
4.	PARTE 2: Estudio del silenciamiento epigenético del gen <i>Rb</i> vía la metilación del ADN en un sistema generado <i>in vitro</i> y en líneas celulares de gliomas	91
4.1.	Planteamiento del problema	91
4.2.	Justificación	92
4.3.	Hipótesis	92
4.4.	Objetivo general	92
4.4.1.	Objetivos particulares	93
4.5.	Resultados y Discusión	95

4.6. Conclusiones	113
4.7. Perspectivas	116
5. MATERIAL Y MÉTODOS	117
5.1. Líneas celulares	117
5.2. Metodologías	124
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151
7. APÉNDICES	168
7.1. Tabla de oligonucleótidos	168
7.2. Tabla de plásmidos	169
7.3. Tabla de anticuerpos	160
7.4. Publicaciones	170

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Regulación de la expresión génica

En los organismos multicelulares la mayoría de ADN no es transcrito y traducido a una proteína funcional. Estas regiones del genoma son conocidas como no-codificantes. Por otro lado, también existen regiones que contienen genes cuya expresión está limitada a un tipo celular particular. Entonces, aunque todas las células de un organismo contienen juegos idénticos de ADN, los genes se expresan de una manera muy específica de acuerdo al tipo de tejido y el momento específico del desarrollo del organismo. Esto implica que debe existir una regulación precisa y finamente regulada de la expresión de los genes en tiempo y espacio.

La regulación de la expresión génica se refiere a todos los procesos involucrados en el control de la cantidad y del tiempo en el que aparece el producto de un gen. Éstos incluyen desde la conformación y estructura del ADN, la transcripción de ADN a ARN, las modificaciones post-transcripcionales que sufre el ARN, la traducción del ARN, hasta las modificaciones post-traduccionales de las proteínas. El hecho de que existan una serie de procesos que son regulados tanto en conjunto como de manera individual, le proporciona a la célula la flexibilidad de adaptarse a un medio ambiente variable, a señales externas, al daño celular, etcétera. Dicho de otra manera, la regulación génica le confiere a la célula el control sobre sus estructuras y todas sus funciones, y es la base

para la diferenciación celular, la morfogénesis y la versatilidad y adaptabilidad del organismo [Zaidi *et al.*, 2004, Tomilin, 2008; Martinez y Walhout, 2009; Mattick *et al.*, 2009].

La regulación transcripcional ocurre en dos niveles principales, el genético y el epigenético. El primer nivel considera fundamentalmente la integridad de la secuencia nucleotídica. Aquí se incluye la participación de factores transcripcionales y de secuencias reguladoras tales como promotores, “enhancers” o potenciadores, “insulators” o delimitadores y silenciadores. En contraste, el nivel de regulación epigenético, incluye procesos como: la modificación post-traducciona l de histonas, la metilación del ADN, la actividad de complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP (CRC-ATP), la actividad de complejos Polycomb (PcG) y Trithorax (TrxG), los mecanismos de los ARN no-codificantes y la participación de la organización y dinámica nuclear, que se sabe, están involucrados en casi todos los procesos relacionados con la homeostasis celular [Weinberg, 1991; Spitale *et al.*, 2011]. Todos estos procesos epigenéticos ocurren en el núcleo celular en el contexto de la cromatina y para su mejor entendimiento, es necesario empezar por definir a grandes rasgos algunos conceptos básicos relacionados con la estructura de la cromatina.

1.2. La estructura de la cromatina

La entidad fundamental para la regulación epigenética es la cromatina, una estructura altamente organizada que está constituida por la asociación de ADN, histonas y proteínas no histonas formando complejos nucleoproteicos. En 1928 Emil Heitz describió que en los núcleos de células en interfase existe una “sustancia” que se tiñe con ciertos colorantes y esta tinción era menos intensa que cuando se tiñen cromosomas. Esta “sustancia” se definió como la cromatina. Heitz pudo distinguir entre la eucromatina, cuya tinción es difusa, y la heterocromatina, que se tiñe intensamente (Figura 1). Tiempo después se determinó que las diferencias en la intensidad de la tinción son debido al grado de compactación del ADN [Heitz, 1928]. La cromatina tiene como función principal la organización y empaquetamiento de ADN en el núcleo celular, de manera que permita, en primera instancia, contener al genoma al interior del núcleo. La cromatina se clasifica según su conformación en dos tipos diferentes:

- **Heterocromatina**, la cual está altamente compactada, constituye regiones genómicas pobres en genes, es transcripcionalmente inactiva y se replica al final de la fase S del ciclo celular. Además, contiene histonas hipoacetiladas, se le incorpora de manera abundante la proteína de heterocromatina, HP1, es rica en secuencias repetidas y el ADN está metilado [Grewal y Elgin2002]. A su vez, existen dos tipos de heterocromatina, la facultativa y la constitutiva. La primera puede re-estructurarse como eucromatina mediante señales específicas en

determinadas etapas del ciclo celular o durante el desarrollo y diferenciación celular. La heterocromatina constitutiva permanece compacta a través de todo el ciclo celular, es rica en secuencias repetidas con características específicas y a nivel molecular se caracteriza por marcas epigenéticas como la trimetilación de las lisinas 9 y 27 de la histona H3 (H3K9me3 y H3K27me3, respectivamente) y la trimetilación de la lisina 20 de la histona H4 (H4K20).

- **Euromatina**, representa un tipo de cromatina que se encuentra en un estado relajado, es característica de regiones genómicas ricas en genes, es transcripcionalmente activa y se replica temprano en la fase S del ciclo celular. Contiene histonas hiperacetiladas y los genes que se encuentran activos están además enriquecidos principalmente con histonas H3 metiladas en las lisinas 4, 36 y 79, aunque contienen otras modificaciones asociadas con cromatina transcripcionalmente activa [Jenuwein y Allis, 2001; Sarma y Reinberg, 2005].

La unidad básica y fundamental de la cromatina es el nucleosoma, el cual consiste en un octámero de proteínas histonas con dos copias de cada una de las proteínas H2A, H2B, H3 y H4, enrolladas por 147 pares de bases (pb) de ADN (Figura 2) [Luger *et al.*, 1997]. Actualmente se ha demostrado que modificaciones enzimáticas al ADN y a las histonas influyen múltiples procesos en el organismo. Las histonas son proteínas pequeñas de naturaleza básica que contienen un dominio globular y un extremo flexible

cargado eléctricamente de tipo amino, el cual sobresale del nucleosoma y es donde se llevan a cabo las modificaciones post-traduccionales que contribuyen a la apropiada regulación de la expresión génica.

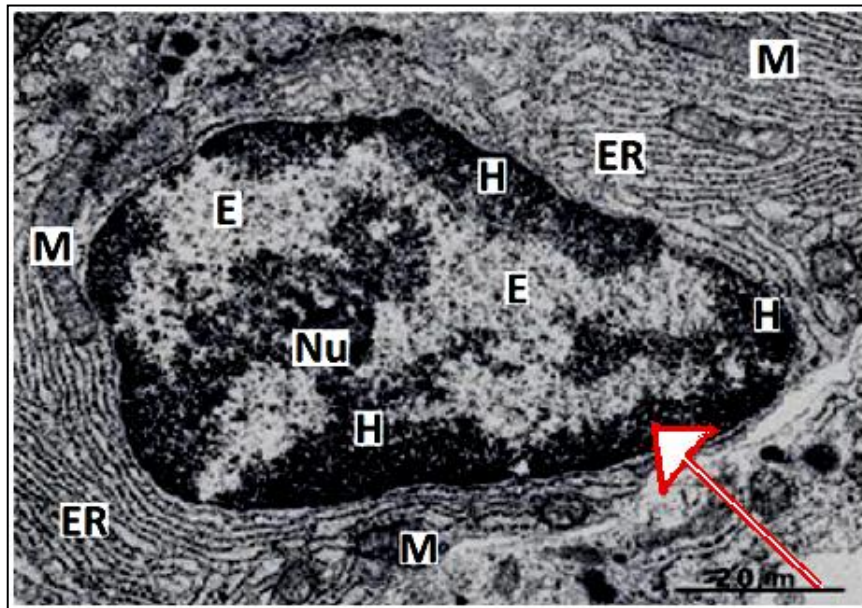


Figura 1. Micrografía electrónica donde se muestran algunas estructuras celulares. En la imagen se puede ver la organización o distribución de los diferentes tipos de cromatina. La eucromatina se localiza hacia el centro del núcleo, mientras que la heterocromatina se asocia principalmente a la periferia nuclear, adosada a la envoltura nuclear en asociación con la lamina (flecha). ER: retículo endoplásmico, M: mitocondria, Nu: núcleo, E: eucromatina, H: heterocromatina.

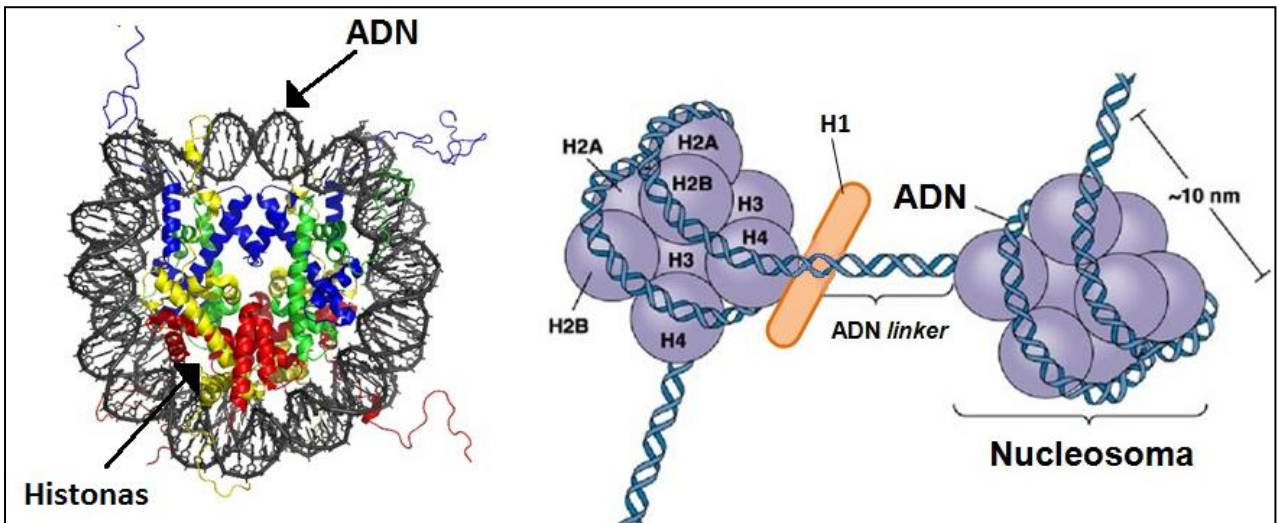


Figura 2. Representación gráfica de un nucleosoma. A la izquierda se muestra una vista superior del nucleosoma. El ADN (gris) está enrollando al octámero de histonas conformado por los dímeros de proteínas H2A y H2B (amarillo y rojo, respectivamente) y H3 y H4 (verde y azul, respectivamente). A la derecha se muestran dos nucleosomas contiguos señalando el ADN entre ellos como *ADN linker* y la histona asociada H1. El tamaño aproximado de cada nucleosoma de 10 nm de diámetro.

1.3. Regulación epigenética

Cada célula dentro de un organismo multicelular tiene características distintivas determinadas por sus patrones de expresión génica, los cuales son únicos y finamente regulados. Dicha identidad celular es salvaguardada y transmitida a las células hijas, es decir, se hereda post-mitóticamente tanto por mecanismos que pueden ser genéticos, es decir que están íntimamente ligados a la secuencia del ADN, como por mecanismos epigenéticos, los cuales no alteran la secuencia y que se encuentran estrechamente ligados a la estructura de la cromatina [Lund y van Lohuizen, 2004]. La regulación epigenética es crucial en el desarrollo de mamíferos y en la herencia de los mecanismos

de regulación que son esenciales para el mantenimiento de las funciones tejido- y célula-específicas [Lund y van Lohuizen, 2004]. Los procesos involucrados en dicha regulación son múltiples e interdependientes y entre ellos se encuentran: a) las modificaciones post-traduccionales de las histonas, b) la metilación del ADN, c) los complejos de remodelaje dependientes de ATP, d) los ARNs no-codificantes, e) la familia de represores/activadores Polycomb (PcG) y Trithorax (TrxG) y más recientemente f) la organización al interior del núcleo y su dinámica [Guasconi *et al.*, 2004; Lund y van Lohuizen, 2004; Baylin y Ohm, 2006].

A continuación se describe brevemente en qué consiste cada uno de los mecanismos epigenéticos antes mencionados, excepto en lo referente a la metilación del ADN de cual se profundizará más adelante, dado que es el área en la que se centra el presente trabajo de investigación.

1.3.1. Modificaciones post-traduccionales de histonas












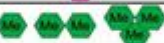



Uno de los aspectos fundamentales de regulación de la expresión génica a nivel epigenético es la modificación covalente en el extremo amino de las histonas. Se ha propuesto que estas modificaciones alteran la función de los cromosomas a través de al menos dos mecanismos. El primero sugiere las modificaciones cambian la naturaleza de

la interacción electrostática de las histonas con el ADN. El segundo propone que las modificaciones generan sitios de unión o señales de reconocimiento para proteínas con bromo- y cromo-dominios, las cuales reconocen a las lisinas acetiladas o metiladas [Füllgrabe *et.al.*, 2011]. Entre las modificaciones principales que sufren las histonas están la acetilación/desacetilación que la realizan las proteínas acetil-transferasas de histonas (HATs) y desacetilasas de histonas (HDACs), respectivamente y la metilación llevada a cabo por metil-transferasas de histonas (HMTs). Además, las histonas pueden ser fosforiladas, ubiquitinadas, sumoiladas y ADP-ribosiladas [Ruthenburg *et al.*, 2007]. Algunas de estas modificaciones son excluyentes dependiendo los residuos modificados, sin embargo, en ciertos casos es necesario que coexistan para desencadenar un efecto regulatorio específico a nivel epigenético [Reid, 2009]. La co-existencia y combinación de diferentes modificaciones ocurre generalmente en el extremo amino de las histonas y es lo que se conoce como el “código de histonas” propuesto inicialmente por Strahl y Allis en 2000.

Todas estas modificaciones tienen un efecto inmediato posterior sobre la regulación epigenética, por ejemplo, en el remodelamiento nucleosomal o la metilación del ADN. Un aspecto que es importante aclarar es que, todos estos, son procesos interrelacionados que actúan de manera coordinada e interdependiente para determinar el estado transcripcional de un gen en particular [Guil y Esteller, 2009]. En la Tabla 1 se muestran algunas de las modificaciones que frecuentemente ocurren en las histonas, así como el

efecto que causan en tres de los modelos biológicos de estudio más empleados en el laboratorio, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* y mamífero.

Tabla 1. Modificaciones epigenéticas en las histonas canónicas H3 y H4 que ocurren en diferentes organismos.

Posición	Modificación	<i>Drosophila</i>	Mamífero	<i>Arabidopsis</i>
H3K4		EU	EU	EU
H3K9		EU	EU	EU
		HET	EU	HET
		HET	EU, fac. HET	HET
H3K9		HET	HET	EU
		HET	HET	EU
H3S10		EU	EU	HET
H3K14		EU	EU	EU
H3K27		HET, EU	HET, EU	HET
		HET, EU	EU	HET
		HET, EU	EU, fac. HET	EU
H3K36		EU	desconocido	EU
H4K20		HET, EU	EU, fac. HET	HET
		HET, EU	EU	EU
		HET, EU	HET	EU

EU: Eucromatina, HET: Heterocromatina, fac HET: Heterocromatina facultativa

Las modificaciones post-traduccionales de las histonas también participan en otros procesos celulares tales como la replicación y reparación del ADN, la condensación y segregación de los cromosomas y hasta en la apoptosis. Así mismo, cada vez hay más evidencias que señalan que la desregulación de estos procesos, por causa de las modificaciones post-traduccionales de las histonas, está relacionada o contribuye a la

carcinogénesis. De hecho, recientemente se ha definido el término de “oncomodificaciones de histonas” y a la fecha solo se ha descrito que alrededor de 60 residuos de las histonas pueden tener modificaciones que han sido relacionadas con cáncer (Figura 3A) [Kouzarides, 2007; Wang *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2010]. Un ejemplo muy claro es que en varios tipos de tumores primarios se ha observado la pérdida de acetilación global de la lisina 16 y la pérdida de la trimetilación de la lisina 20 de la histona H4 a lo largo de regiones de ADN ricas en secuencias repetidas. Además, estos cambios correlacionaron con hipometilación del ADN en esas mismas regiones [Fraga *et al.*, 2005]. Así mismo, también se ha descrito que las enzimas modificadoras de histonas son reguladas de manera anormal en cáncer, ya sea incrementando o disminuyendo de manera anormal su expresión (Figura 3B) [Füllgrabe *et al.*, 2011].

Estos son aspectos que hemos estudiado en los últimos años en el grupo de investigación y que forman parte del tema de investigación de esta tesis.

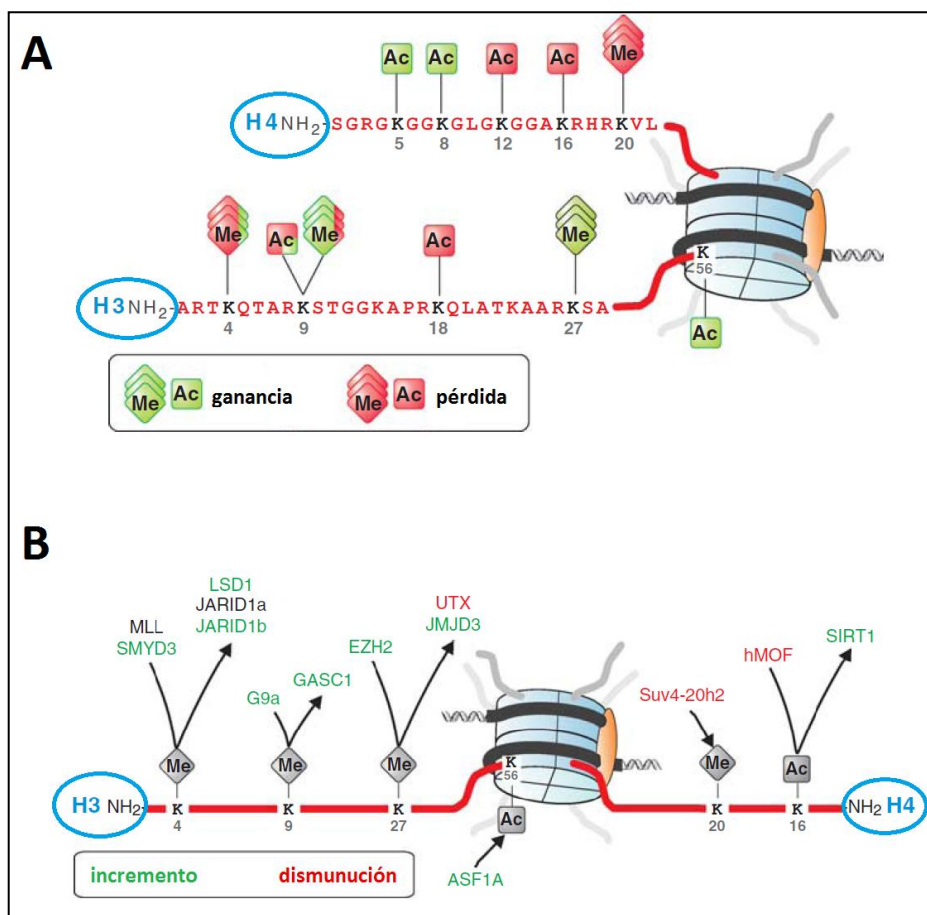


Figura 3. Enzimas modificadoras de histonas y onco-modificaciones de histonas. **A-** Modificaciones post-traduccionales que se han descrito en cáncer. Las representadas en verde se adquieren y las representadas en rojo se pierden. Los cuadros representan acetilación y los rombos metilación. **B-** Enzimas modificadoras de histonas que son des-reguladas en cáncer. Las escritas en verde aumentan su expresión, las escritas en rojo disminuyen su expresión y las escritas en negro son proteínas generadas por una fusión. Modificado de Füllgrabe *et.al.*, 2011.

1.3.2. Metilación del ADN

La metilación del ADN es una modificación covalente en donde la citosina (Figura 4) es metilada en la posición 5' en una reacción catalizada por ADN metiltransferasas (DNMTs) utilizando la S-adenosil-metionina (SAM) como donador del grupo metilo. En

mamíferos, esta metilación ocurre principalmente en el contexto del dinucleótido CpG y puede ser catalizada por tres diferentes enzimas, DNMT1, DNMT3a y DNMT3b. Fisiológicamente, la metilación del ADN, se divide en dos tipos: la metilación *de novo* y la metilación de mantenimiento. El primer tipo de metilación es llevado a cabo por las DNMT3a y DNMT3b, es importante para el establecimiento de los patrones de metilación temprana en embriones, durante la diferenciación y durante la carcinogénesis [Okano *et al.*, 1999]. Con la finalidad de mantener estos patrones de metilación, la DNMT1, está localizada en la horquilla de replicación durante la división celular y lleva a cabo la metilación de mantenimiento [Leonhardt *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1998]. Sin embargo, en regiones densas en CpG, la DNMT1 puede ser ineficiente, por lo que, en células somáticas las DNMT3a y DNMT3b son necesarias para conservar y reafirmar los patrones de metilación [Liang *et al.*, 2002; Miranda y Jones, 2007].

Por evidencia experimental, se sugiere que fisiológicamente la metilación del ADN representa un mecanismo de defensa del organismo, es decir, la metilación contribuye para silenciar genoma de origen exógeno, además se ha comprobado que la metilación estabiliza el ADN durante la replicación [Bogdanović y Veenstra, 2009]. La metilación del ADN a lo largo del genoma está enriquecida en regiones no-codificantes, por ejemplo, en heterocromatina centromérica y en elementos (secuencias) del tipo repetidos como los transposones. En contraste, hay escasa presencia de metilación del ADN en las regiones ricas en dinucleótidos CpG de genes activos. Es así que un punto que sirve para

comparar genomas distintos, es el hecho de que los niveles de metilación correlacionan con el contenido de ADN no-codificante y secuencias repetidas en cada genoma [Deaton y Bird, 2011].

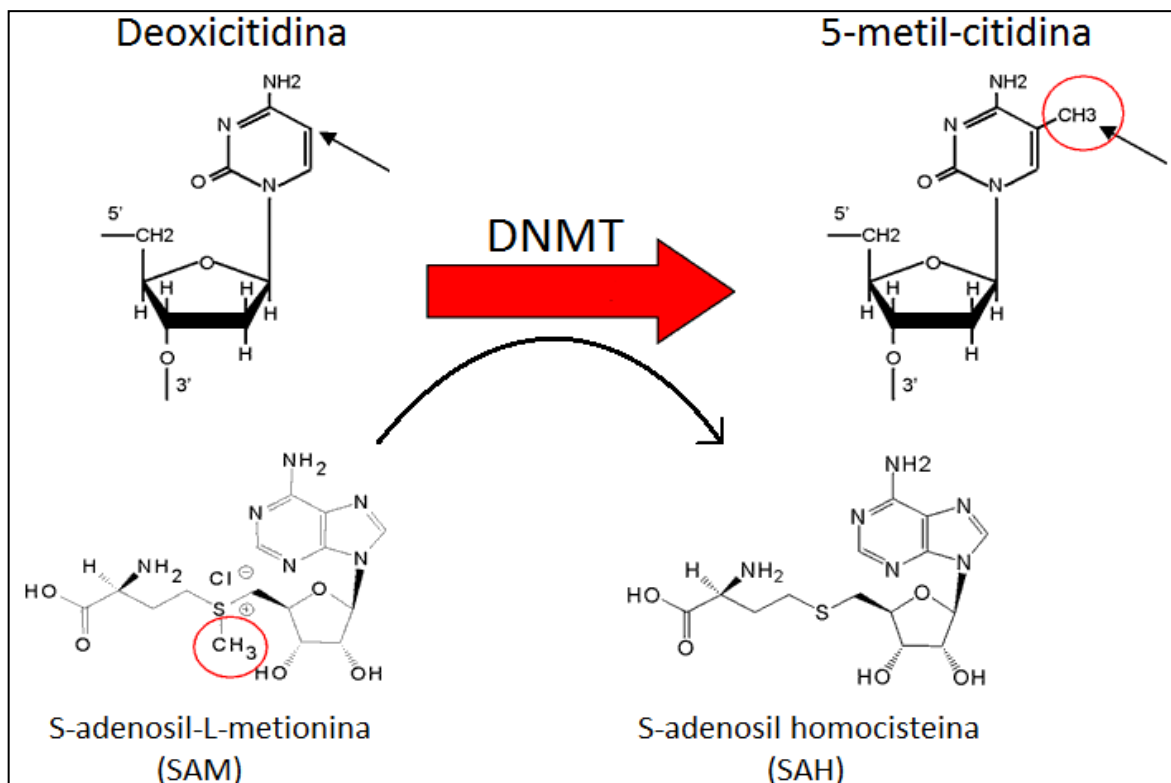


Figura 4. Esquema simplificado de la reacción de metilación del ADN. El carbono de la posición 5 de la citidina, señalado con una flecha, es donde se adicionará el grupo metilo para generar la 5-metil-citidina. Esta reacción es catalizada por la metilasa de ADN utilizando como grupo donador a la S-adenosil-L-metionina que se convertirá a S-adenosil-homocisteína. DNMT: Metiltransferasa de ADN, SAM: S-adenosil-L-metionina, SAH: S-adenosil-homocisteína.

Como una modificación epigenética, la metilación que conlleva al silenciamiento génico a largo plazo, es heredada a través de las divisiones celulares, así mismo, participa en la organización de la cromatina en heterocromatina debido a la incorporación de proteínas afines a secuencias de ADN metiladas y a la consecuente atracción de complejos represores adicionales [Miranda y Jones, 2007].

Desde que se estableció que la metilación del ADN correlacionaba con secuencias altamente enriquecidas de nucleótidos citosina y guanina (C y G, respectivamente), se acuñó el término “Isla CpG”. Al referirse a una isla CpG, se entiende que debido a la alta cantidad (mayor al 55%) de C y G en una región dada, la probabilidad de encontrar dinucleótidos CpG es mucho mayor que en cualquier otra secuencia de ADN, lo que se definió de la siguiente manera: $\frac{CpG\ observada}{CpG\ esperada} = 0.65$, es decir, que cualquier secuencia de ADN de 500 a 3000 pb que cumpla con esta ecuación es considerada como isla CpG [Takai y Jones, 2002]. En función de este razonamiento se clasificó a las islas CpG en 3 diferentes grupos: regiones pobres, intermedias o ricas en CpG. Aproximadamente el 70% de los genes anotados contienen islas CpG y alrededor de la mitad de estas islas CpG coinciden con sitios de inicio de transcripción y están asociadas a los promotores de estos genes. En este grupo, están incluidos los genes de expresión constitutiva, así como algunos genes con expresión tejido-específica y genes reguladores del desarrollo [Jones y Bayling, 2002; Deaton y Bird, 2011]. Por otra parte, la mayoría de las regiones

intergénicas y las intrónicas son consideradas regiones pobres en CpG y por lo general se encuentran metiladas [Deaton y Bird, 2011].

Por otra parte, aunque desde hace veinte años se sabe que la metilación correlaciona con el silenciamiento génico, es hasta hace poco que se han propuesto algunos mecanismos por los cuales la metilación influye sobre la regulación de la transcripción. Básicamente existen tres modelos propuestos:

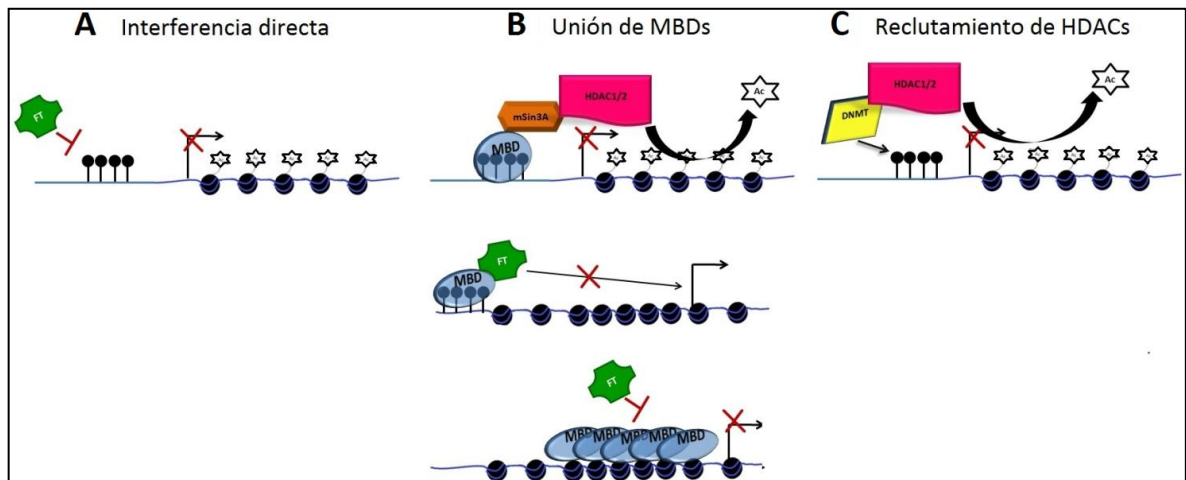


Figura 5. Modelos propuestos para explicar el mecanismo de silenciamiento génico mediado por la metilación del ADN. **A-** Modelo de interferencia directa. La metilación por sí misma impide la unión de factores de transcripción en los promotores de sus genes blanco. **B-** Modelo de unión de MBDs. La metilación del ADN promueve la incorporación de MBDs y éstas a su vez atraen HDACs y co-represores como Sin3A. Por otra parte, las MBDs retienen a los factores de transcripción para que éstos no puedan activar a sus genes blanco. Finalmente las MBDs pueden funcionar como “cubierta” e impedir la unión de cualquier factor de transcripción. **C-** Modelo de reclutamiento de HDACs. Las HDACs son reclutadas a sus sitios blanco por la interacción directa con las DNMTs y promueven así la desacetilación de las histonas y por consecuencia, favorecen la formación de heterocromatina.

- I) **Modelo de interferencia directa.** Este modelo sugiere que la metilación del ADN por sí misma impide directamente la unión de factores de transcripción a sus sitios blanco, bloqueando de esta manera la transcripción (Figura 5A) [Jones *et al.*, 1998; Jorgensen *et al.*, 2004].
- II) **Modelo de unión de proteínas que reconocen ADN metilado (MBDs).** Otro de los mecanismos propuestos, se basa en la idea de que la metilación del ADN promueve cambios en la estructura de la cromatina vía modificación de las histonas y la presencia de nucleosomas en las regiones promotoras de los genes (Figura 5B) [Jones *et al.*, 1998, Nan *et al.*, 1998; Fuks *et al.*, 2003b; Harikrishnan *et al.*, 2005]. Es decir, se propone que la metilación del ADN incorpora a proteínas que se unen específicamente a CpGs metilados. Esta familia de proteínas que se unen a ADN metilado llamada MBDs, por sus siglas en inglés *Methyl-CpG-Binding Domain Proteins*, consta de varios miembros que comparten un dominio homólogo de unión a CpG metilado, dominio MBD por sus siglas en inglés *Methyl Binding Domain*. Además existe un miembro no homólogo llamado Kaiso, el cual reconoce el motivo CGCG cuando está metilado, es decir reconoce la secuencia C^mGC^mG [Sansom *et al.*, 2007]. El mecanismo de acción de las MBDs se ha propuesto que puede ser vía la unión con desacetilasas de histonas y co-represores de la transcripción,

los cuales suscitan la formación de cromatina compacta [Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998; Harikrishnan *et al.*, 2005].

- III) **Modelo de reclutamiento de enzimas desacetilasas de histonas (HDACs).** En este modelo se ha propuesto que la metilación del ADN evita la propagación de las marcas de cromatina activa vía el reclutamiento de HDACs mediado por DNMTs (Figura 5C) [Fuks *et al.*, 2003a Hu *et al.* 2006].

En suma, conservar y mantener adecuadamente los patrones de metilación del ADN es un requisito para el desarrollo normal de un organismo y para su buen funcionamiento. Además de la represión génica, la metilación del ADN está involucrada en otros procesos tales como la diferenciación celular, la impronta genómica, la inactivación del cromosoma X y con el desarrollo de diferentes patologías, entre ellas cáncer [Bird, 2002]. Así mismo, la importancia de la metilación del ADN se ha subrayado debido al creciente número de enfermedades humanas que, se ha demostrado, ocurren cuando esta marca epigenética no es establecida ni mantenida en el tiempo de manera apropiada. Por ejemplo, durante el desarrollo de cáncer, muchas de las islas CpG que se encuentran inmersas en los promotores de genes supresores de tumores, se hipermetilan anormalmente. Por otra parte, las regiones con CpG en secuencias

repetidas y en cromatina peri-centromérica, pierden la metilación, lo que conlleva, entre otros eventos, a la inestabilidad del genoma (Figura 6).

Esta alteración en el patrón de metilación del ADN lleva a cambios en la estructura de la cromatina y consecuentemente en la regulación génica [Jones y Baylin, 2002]. Por lo que actualmente hay un creciente interés por una parte, en entender los eventos paso a paso durante el establecimiento y mantenimiento de la metilación del ADN y de cómo bajo ciertas circunstancias, se pierde el control de este proceso epigenético. Y por otra parte, es importante desarrollar nuevas opciones farmacológicas que ayuden a revertir anomalías epigenéticas [Robertson, 2005].

En este trabajo de tesis se abordan preguntas en relación a la contribución de la metilación en el ADN, particularmente en la des-regulación epigenética del gen supresor de tumores Retinoblastoma, sobre el cual se profundizará en una sección más adelante.

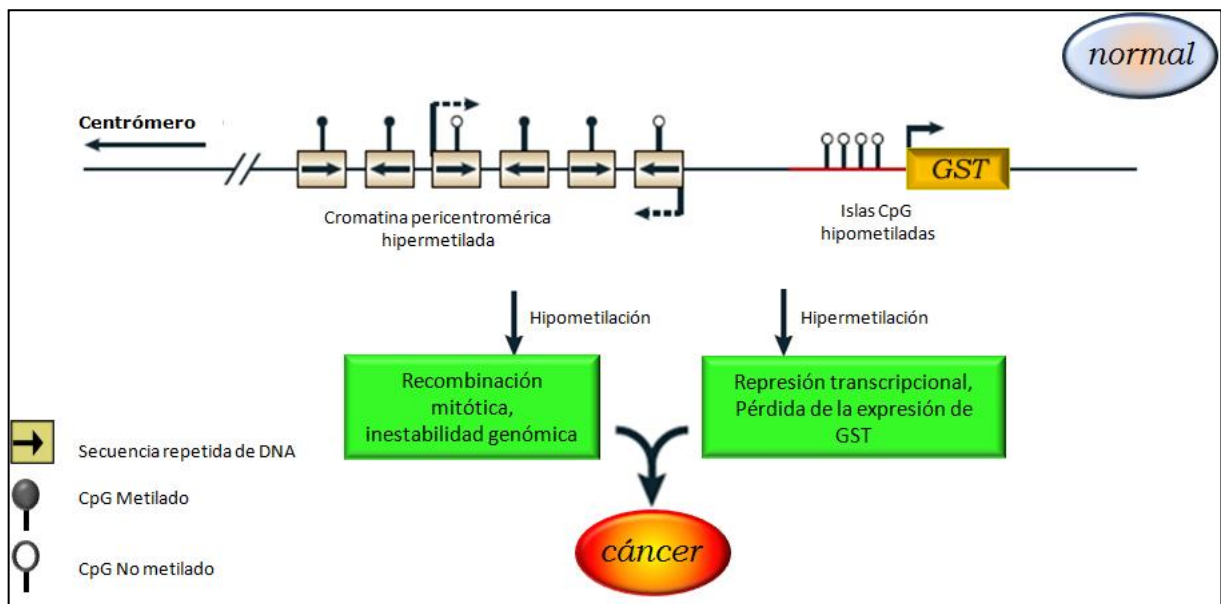


Figura 6. La relación de la metilación del ADN con el desarrollo de cáncer. El diagrama muestra una región representativa del genoma en una célula normal. La región contiene secuencias repetidas y heterocromatina pericentromérica hipermetilada y un gen supresor de tumores (GST) con una isla CpG hipometilada (mostrada en rojo) que es transcrito activamente. En células de tumor, las secuencias repetidas y la heterocromatina ahora se hipometilan y esto contribuye a la inestabilidad genómica, una característica de las células tumorales, lo cual incrementa los eventos de recombinación. La metilación *de novo* en las islas CpG, también ocurre en células cancerosas, lo que puede causar silenciamiento transcripcional. Todos estos cambios en la metilación pueden ser los eventos tempranos en la tumorigénesis. GST: gen supresor de tumores. Modificado de Robertson, 2005.

1.3.3. Complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP

En las células eucariontes el ADN es empaquetado de tal manera que pueda ser contenido en el núcleo y se calcula que está alrededor de 10000 veces compactado. No obstante esta estructuración de alto orden, el ADN debe ser accesible para llevar a cabo procesos celulares como la replicación, la transcripción, la recombinación y reparación en caso de daño, así como el desarrollo y la diferenciación celular. Dicha accesibilidad

es facilitada por los complejos remodeladores de cromatina que utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para “reorganizar” la estructura de la cromatina a través de desplazar parcialmente a los nucleosomas [Saladi y de la Serna, 2010; Hargreaves y Crabtree, 2011]. En la Tabla 2 se muestra un breve compendio de las cuatro familias y subfamilias de los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP (CRC-ATP) que han sido caracterizados hasta ahora.

Tabla 2. Características de las familias descritas de los complejos remodeladores dependientes de ATP (CRC-ATP).

Complejos Remodeladores de cromatina dependientes de ATP				
Familias	SWI/SNF	INO80	ISWI	CHD
Dominio característico	Bromodominio	DEXD/Helicasa	SANT	Cromodominio
Subfamilias			<ul style="list-style-type: none"> • NURF • ACF • CHARC 	
ATPasa	Baf47 y Baf155/170	INO80	Snf2h y Snf2l	CHD1, 3, 4

Modificado de Saladi y de la Serna, 2010 y Hargreaves y Crabtree, 2011

Las proteínas de éstas familias se asocian entre ellas para formar complejos multi-proteicos que se distinguen entre sí principalmente por sus subunidades catalíticas, las cuales les permiten “leer” las modificaciones de las histonas, de tal manera que estabilizan su interacción con la cromatina en regiones específicas del genoma y pueden

entonces inducir los cambios que se requieran, desde promover otras marcas a las histonas, reposicionar y reemplazar nucleosomas, incorporar al nucleosoma variantes de histonas, hasta facilitar la unión de reguladores transcripcionales al ADN, que en consecuencia promoverán o bloquearán la expresión génica [Becker y Hörz, 2002; Wang *et al.*, 2007; Saladi y de la Serna, 2010].

Como se ha mencionado, la desregulación de estos procesos epigenéticos correlaciona cada vez más con el desarrollo de enfermedades. En el caso de los CRC-ATP, existen estudios que demuestran la posible implicación de los complejos BAF con la iniciación y progresión del cáncer. Es decir, se demostró que en células tumorales hay una pérdida de expresión de las proteínas BRG1 y hBRM que constituyen a los complejo BAFy que si se induce la expresión de estos genes, ocurre un arresto del crecimiento celular [Dunaief *et al.*, 1994; Reisman *et al.*, 2009]. Así mismo Versteeg en 1998 fue el primero en demostrar experimentalmente que los complejos BAF actúan como supresores de tumores, dado que su ausencia induce la proliferación y contribuye a la oncogénesis ya sea por defectos genéticos o vía la metilación del ADN [Versteeg *et al.*, 1998 y 2002]. Además se encontró que BAF47 (SNF5 en levadura) también puede ser silenciado por el complejo Polycomb [Wilson *et al.*, 2010]. Por otra parte, en diferentes tipos de cáncer tales como de próstata, pulmón, seno, pancreático y renal se ha demostrado la ausencia de otros miembros del complejo BAF, tales como BRG1, ARID1A (BAF250a), BRD7 y PBRM1, lo cual les concede un papel como reguladores

epigenéticos de genes involucrados en el desarrollo de cáncer [Zhang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2004; Bultman *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2008; Drost *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2010].

Finalmente, se ha demostrado que mecanísticamente, los CRC-ATP contribuyen al mantenimiento de la integridad genómica por su interacción física con otras proteínas supresoras de tumores tales como Rb, p53, BRCA1 y p19^{ink4a}/p19^{ARF}, revelando posibles nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de cáncer y otras enfermedades relacionadas con los CRC-ATP. Este hecho evidencia otros papeles epigenéticos funcionales de los reguladores clásicos del ciclo celular antes mencionados [Zhang *et al.*, 2000; Bultman *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2008; Drost *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2010]. Sin embargo, son necesarios más estudios para entender completamente como la pérdida de los CRC-ATP está relacionada con la desorganización de los procesos celulares básicos.

1.3.4. Los ARNs no-codificantes y la regulación epigenética

La secuenciación del genoma humano sorprendió a muchos cuando se determinó que hay solamente alrededor de veinte mil genes que codifican proteínas, representando menos del 2% del total de la secuencia genómica [Consortio Internacional de Secuenciación del Genoma Humano, 2004]. Este número de genes es similar al número

de genes en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, lo cual nos hace pensar que la complejidad fisiológica que distingue a los organismos, no se explica únicamente por el número de genes. Uno de los acercamientos para tratar de explicar la complejidad del genoma son los estudios enfocados en explicar los posibles papeles funcionales del 98% del genoma no-codificante [Wilusz *et al.*, 2009].

Entre el 70 y 90% de los transcritos de ARN no-codificantes (ARNnc) presentes en el genoma humano confluyen en tiempo y espacio, generando una compleja red de decenas de miles de ARNnc de diferentes tamaños, desde 20 nucleótidos hasta kilobases de longitud [Kapranov *et al.*, 2007]. Actualmente existe el debate de si esta transcripción omnipresente contribuye de alguna manera a la regulación de la expresión génica [Mattick y Makunin, 2006; Wang *et al.*, 2004; Struhl, 2007; Ebisuya *et al.*, 2008]. No obstante, el hecho de que la polimerasa II transcriba regiones no-codificantes intergénicas e incluso ciertas regiones dentro de los propios genes, generando los diversos transcritos, sugiere fuertemente que sí pueden tener papeles funcionales y regulatorios clave.

1.3.4.1. Los ARNnc largos

Se ha demostrado que los ARNnc de gran tamaño tienen papeles como reguladores de la actividad transcripcional participando en la degradación de ARN

mensajeros y regulando la actividad de proteínas. Así mismo, se ha demostrado que participan en la estructuración y organización nuclear, un ejemplo claro es la inactivación del cromosoma X por el ARNnc XIST. También alteran el procesamiento de ARN y sirven como precursores de ARNs pequeños o micro ARNs. Todos estos papeles se muestran integrados en la figura 7 [Wyers *et al.*, 2005, Neil *et al.*, 2009]. Aunado a lo anterior, se demostró que estos transcritos no-codificantes largos son regulados durante el desarrollo [Rinn *et al.*, 2007; Dinger *et al.*, 2008], además tienen una expresión específica según el tipo celular [Mercer *et al.*, 2009], se localizan en compartimentos sub-celulares específicos [Clemson *et al.*, 2009; Sasaki *et al.*, 2009; Sunwoo *et al.*, 2009] y están fuertemente asociados con algunas patologías humanas [Prasanth y Spector, 2007, Mattick, 2011]. También existe evidencia adicional de que algunos ARNnc de gran tamaño han sido seleccionados evolutivamente, con lo que se refuerza la idea de que la función que estos ARNnc tengan dentro de la célula probablemente sea parte de procesos o mecanismos vitales de la regulación celular [Pollard *et al.*, 2006; Pheasant y Mattick, 2007].

Otras evidencias que implican a los ARNnc en el control epigenético de la arquitectura de la cromatina datan desde varios años atrás. Éstas describen la asociación física del ARN con la cromatina y con proteínas reguladoras de la cromatina, por ejemplo como con las proteínas DNMTs, REST y con algunos miembros de Polycomb. La presencia de dominios de unión a ARN en este tipo de proteínas son los

que fundamentan estas interacciones [Kotake *et al.*, 2011]. Como ejemplo, algunas de las funciones en las que están involucrados algunos ARNnc son la modulación o regulación de la reprogramación celular de las células pluripotentes, la proliferación celular, la regulación de la expresión de los genes homeóticos, la impronta de genes parentales y la compensación de dosis por inactivación del cromosoma X, la senescencia celular y finalmente la organización de estructuras nucleares como las “speackles” o motas [Mercer *et al.*, 2009; Mattick, 2011]. Así mismo, los ARNnc también están involucrados en la regulación de la expresión alelo específico de los genes improntados y de otros genes por ejemplo, los genes supresores de tumores p15 y p53 por su ARN antisentido ANRIL y Wrap53, respectivamente [Mahmoudi *et al.*, 2009; Kotake *et al.*, 2011]. Otros ARNnc que han sido estudiados con detalle son: HOTAIR, Kcnq1ot1 y RepA. HOTAIR, está codificado en el locus HOXC y forma parte de un conjunto de alrededor de 200 ARNnc que se han descrito están relacionados con ese locus. HOTAIR actúa en *trans* reprimiendo la transcripción del locus HOXD, el cual se ha demostrado que regula la actividad del complejo Polycomb, se sobre expresa en diferentes tipos de cáncer y que esta sobre-expresión incrementa la capacidad de invadir otros tejidos y hacer metástasis [Gupta *et al.*, 2010; Kaneko *et al.*, 2010]. Efectos similares han sido descritos para el caso de SPRY4-IN1, otro ARNnc que está sobre-expresado en melanoma [Khaitan *et al.*, 2011]. Por otra parte, Kcnq1ot1 y RepA, interactúan con proteínas Polycomb y las conducen a sus sitios de acción en genes improntados y hacia el cromosoma X que será silenciado [Hekimoglu y Ringrose, 2009].

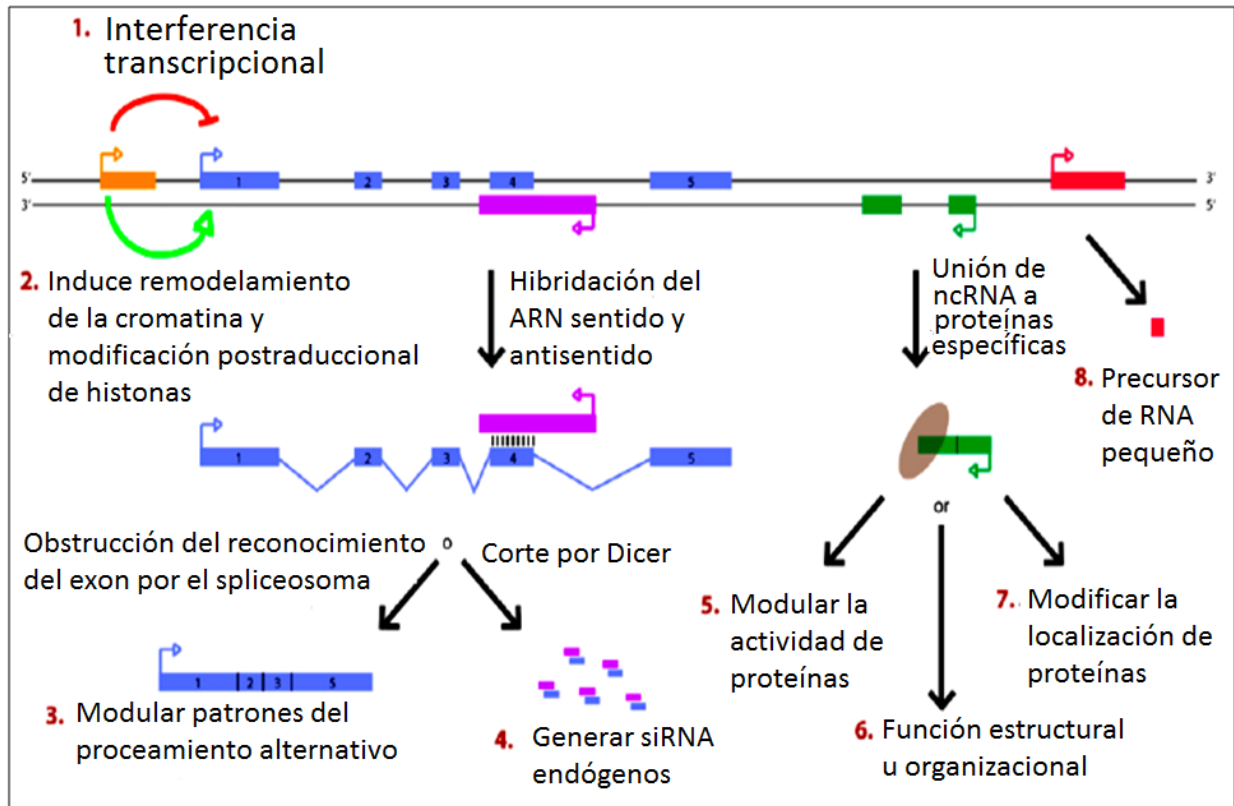


Figura 7. Esquema de los papeles funcionales de los ARN no-codificantes. La transcripción a partir de un promotor no codificante (anaranjado) puede afectar negativa (1) o positivamente la transcripción del gen río abajo vía inhibición del reclutamiento de la ARN polimerasa II o por la inducción del remodelamiento de la cromatina. En el (3) se observa que un transcrito antisentido (morado) es capaz de hibridarse con el transcrito sentido (azul) al cual sobrelapa y bloquear de esta manera los sitios de corte reconocidos por el "spliceosoma", resultando de esta manera un transcrito diferente generado por empalme alternativo. En el (4) se muestra una alternativa donde la hibridación de los transcritos sentido y antisentido permiten a Dicer generar siRNA endógenos que actuarán sobre sus genes blanco. Cuando un transcrito no-codificante (verde) se une a proteínas específicas puede modular la actividad de la proteína (5), servir como un componente estructural que permite formar un complejo proteína-ARN (6), o alterar la localización celular de la proteína (7). Los ARNnc largos (rosa) pueden ser procesados para generar ARN pequeños tales como los miRNAs, piRNAs y otros transcritos menos caracterizados, aunque también pueden actuar directamente debido a su complementariedad con el ADN. Modificado de Wilusz *et al.*, 2009.

1.3.4.2. Los ARNnc pequeños

Otra clase de ARN no-codificantes que también han sido descritos en los años recientes son los ARNs pequeños y dentro de esta categoría, los mejor caracterizados son los microARNs. Al igual que los ARNnc largos, los ARNs pequeños son expresados en tiempo, espacio, tipo celular y hasta organismo-específico, por lo tanto también se les asocia con funciones regulatorias durante el desarrollo y en la diferenciación, entre otros procesos celulares así como con cáncer [Berezikov, *et al.*, 2006; Hertel *et al.*, 2006; Heimberg *et al.*, 2008].

El tamaño de los microARNs es de 21 a 22 nucleótidos y son derivados de ARNs precursores que forman una estructura tallo-asa la cual tiene que ser procesada enzimáticamente para generarlos. La función más caracterizada de los microARNs es su capacidad para regular la estabilidad y traducción de ARNm blanco, a través del reconocimiento, por lo general imperfecto, de secuencias generalmente ubicadas en la región 3' no traducida de los ARNm y por su interacción con la proteína Argonauta que es miembro del complejo de silenciamiento inducido por ARN, también conocido como RISC [Fabian *et al.*, 2010]. Además de los microARNs, existen otros tipos de ARNs pequeños como los pequeños nucleares (ARNpn) y los pequeños nucleolares (ARNpno), los piARN, spliARN y tiARN, los cuales tienen funciones reguladoras diversas en las células y son componentes críticos de varias maquinarias celulares como los ribosomas y el nucléolo [Harrison *et al.*, 2009].

Se calcula que a la fecha se han identificado en el orden de 10^3 ARNs pequeños, de los cuales un número importante está involucrado en enfermedades complejas como el cáncer [Mattick, 2011]. De hecho, a ciertos microARNs ya se les ha clasificado como onco-microARN porque se sobre-expresan en diferentes tipos de cáncer y por analogía también se han clasificado algunos como supresores de tumores *bona fide*, dado que están silenciados en cáncer [Woods *et al.*, 2007; Ivanovska *et al.*, 2008; Balatti *et al.*, 2011; Melo y Esteller, 2011].

El conocimiento de los ARNnc largos y pequeños es, sin duda, solo la punta de un gran iceberg, especialmente si se considera que todas las células que conforman a un organismo, desde invertebrados como el *C elegans* hasta mamíferos como el humano, mantendrán una identidad única y particular regulada por mecanismos epigenéticos incluyendo la contribución de los ARNnc, lo cual es, en parte, apoyado por los estudios con gemelos monocigóticos [Mattick, 2011].

1.3.5. Complejo represor Polycomb

Cada vez se acumula más evidencia que sustenta la participación de las proteínas del grupo Polycomb (PcG) en la regulación transcripcional de genes implicados en la

mayoría de los procesos celulares, tales como el control del ciclo celular, la biología de las células troncales, la diferenciación y el desarrollo entre otros [Schwartz y Pirrotta, 2008]. Los genes del grupo represor PcG y del grupo activador Trithorax (trxG) codifican para reguladores epigenéticos antagónicos. Las proteínas PcG en un inicio se identificaron genéticamente en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, como factores requeridos para mantener la expresión correcta en tiempo y espacio de los genes homeóticos a través del desarrollo [Maeda y Karch, 2006]. La familia Polycomb consiste de alrededor de 20 proteínas, las cuales pueden formar distintos complejos multiprotéicos que tienen la capacidad de influir en la estructuración de la cromatina vía un arreglo compacto de la cromatina mediante distintos tipos de modificaciones post-traduccionales en las histonas [Pien y Grossniklaus, 2007; Margueron y Reinberg, 2011]. Las proteínas PcG se asocian entre ellas para formar diferentes tipos de complejos represivos. Estos complejos se conocen como complejos represores Polycomb 2 y 1 (PRC2 y PRC1, respectivamente).

El complejo PRC2 o complejo de inicio del silenciamiento contiene a la proteína Enhancer de Zeste (E(z)) como parte fundamental del núcleo del complejo [Cao y Zhang, 2004]. El complejo PRC1 también conocido como complejo de mantenimiento del silenciamiento contiene a la proteína Polycomb (Pc). De los complejos PRC1 se ha predicho que en vertebrados existen al menos sesenta combinaciones posibles entre las proteínas que los conforman [Whitcomb *et al.*, 2007]. La mayoría de las proteínas PcG

de *Drosophila*, tienen homólogos en humano y en otras especies que incluyen desde plantas, nemátodos, peces hasta aves. En la tabla 3 se muestra un compendio de estas proteínas y algunas de sus funciones.

El mecanismo de acción de estos complejos se describirá con detalle más adelante, pero de manera muy general se ha demostrado que estos complejos tienen que ser atraídos en forma secuencial a su sitio de acción. El PRC2 es el primer complejo que se recluta y el que inicia el proceso de silenciamiento marcando dicha zona genómica principalmente trimetilando a la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3). Esta marca es “leída” por el complejo represor PRC1 el cual adiciona un residuo de ubiquitina en la lisina 119 de la histona H2A para reforzar el silenciamiento, y además favorecer interacciones con otras proteínas represoras como HP1, DNMTs, HDACs y HMTs [Blomen y Boonstra, 2011].

Además de la regulación de los genes homeóticos, se ha descrito que estas proteínas tienen diversas funciones reguladoras en el control génico de distintos organismos [Lagarou *et al.*, 2008], como *Drosophila* [Schwartz *et al.*, 2006], mamífero [Bracken *et al.*, 2006] y *Arabidopsis* [Whitcomb *et al.*, 2007] donde regulan la proliferación y la diferenciación celular, la capacidad de auto-renovación de las células madre y hasta en los procesos que determinan los distintos linajes celulares. En particular se demostró la participación de las proteínas PcG en el mantenimiento de la

pluripotencialidad y de la memoria celular mediante la generación de ratones mutantes para estas proteínas y se observó que en estos animales no se formaban adecuadamente las células troncales, o bien, las células ya establecidas mostraban una fisiología y diferenciación celular anormal [Vincenz y Kerppola, 2008; Delgado-Olguín y Recillas-Targa, 2011]. Del mismo modo, se ha demostrado que las proteínas PcG participan en el control de la transcripción, en el desarrollo, en la organogénesis, la estabilidad genética, la herencia epigenética de los programas de regulación transcripcional y en enfermedades como el cáncer [Schwartz y Pirrotta, 2008; Wu *et al.*, 2009]. De hecho, existen varios reportes en la literatura donde estudian a miembros específicos de PcG tales como Bmi1, EZH2 y CBX, en los cuales se demostró que se encuentran desregulados en cáncer presentando una expresión anormal [Honig *et al.*, 2010; Suva *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010]. Hecho por el que EZH2 y Bmi1 se han ganado el calificativo de oncogenes.

En *Drosophila*, se han caracterizado secuencias en el ADN responsables de reclutar *in vivo* las proteínas PcG que son conocidos como elementos de respuesta a Polycomb o PRE (por sus siglas en inglés: Polycomb Response Element). Se piensa que estas secuencias tienen un papel central en el silenciamiento génico y una vez establecido, en el mantenimiento de éste a través de las subsecuentes generaciones celulares [Müller y Verrijzer, 2009]. Hasta el año 2007 no se había descrito la existencia de secuencias PRE en mamíferos o en algún otro organismo. Pero fue en 2008 cuando

Ku y colaboradores realizaron un análisis de alta resolución a nivel genómico en células troncales de mamífero, demostrando distribución genómica y la asociación de PcG en ciertas regiones de genes involucrados en el control del desarrollo y la diferenciación celular. En particular se determinó que el 97% de los blancos de PcG coinciden con islas CpG o regiones ricas en CG, lo cual sugirió que podrían ser sitios de acumulación de los complejos PcG con la capacidad de funcionar como los elementos de respuesta similares a los descritos en *Drosophila* [Ku *et al.*, 2008]. Estas evidencias sugieren que proteínas que reconozcan y se unan a regiones ricas en CpGs, pueden contribuir al reclutamiento de PcG, aunque esto no ha sido del todo confirmado. No obstante, estas regiones carecen de una secuencia determinada que sea recurrente, lo cual podría ser útil para identificar otros factores candidatos con la capacidad de reclutar a PcG. En suma, aún resulta difícil identificar en mamíferos secuencias similares a los PREs de *Drosophila* con la capacidad de atraer a PcG a sus genes blanco, más aún, es difícil definir las condiciones en las que Polycomb es atraído a secuencias blanco específicas, ya que éstas varían de acuerdo al tipo y contexto celular [Simon y Kingston, 2009]. Actualmente existen únicamente tres artículos, incluyendo el de Simon y Kingston en 2009, que mediante diferentes estrategias experimentales, han definido más claramente la posibilidad de que en mamíferos [Woo *et al.*, 2010] y otras especies existan estas secuencias de reclutamiento para PcG y que además participen en la regulación transcripcional de los genes blanco de PcG [Liu *et al.*, 2010]. En resumen, este aspecto

resulta relevante dado que el definir secuencias tipo PRE pudiera permitir predecir y reconocer sitios de acción del complejo Polycomb en el genoma de diversos mamíferos.

En relación con lo anterior, y como parte de los estudios de esta tesis, resulta importante resaltar la importancia que tienen proteínas como la familia de factores de transcripción E2F, en particular E2F6, que interactúan con miembros de PRC1 y PRC2 y que hasta ahora son los mejores candidatos que atraen a PcG a sitios sus sitios de acción. Aunque, los blancos se limitan a los genes que tengan sitio de unión de factores E2F en su secuencia regulatoria. Más adelante se detallará este aspecto [Trimarchi *et al.*, 2001; Ogawa *et al.*, 2002; Attwooll *et al.*, 2005; Storre *et al.*, 2005].

A continuación se describirán brevemente algunas características de las proteínas que forman cada uno de los dos complejos represores de Polycomb, esto con la finalidad de entender mejor cómo se induce la formación de cromatina inactiva o compacta.

1.3.5.1. Complejo de inicio del silenciamiento o complejo represor

Polycomb 2 (PRC2)

El complejo PRC2 está conformado por diferentes proteínas de la familia PcG (Figura 8), sin embargo la proteína central de este complejo es Enhancer de zeste 2

(EZH2), quien es una metiltransferasa de histonas específica de lisina (HKMT), con un dominio SET que cataliza principalmente la trimetilación de la lisina 27 (H3K27me3) [Cao *et al.*, 2002]. Así mismo, EZH2 también cataliza la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3) y la metilación de la lisina 26 de la histona H1 (H1K26), marcas de cromatina cerrada, aunque estas modificaciones ocurren con menor frecuencia que la H3K27me3 [Chen *et al.*, 2005]. En el complejo PRC2, además de EZH2, existen otras proteínas que forman parte del núcleo del complejo y que son esenciales para su actividad catalítica, tales como Supresor de Zeste 12 (SUZ12), la proteína de desarrollo del ectodermo embrionario (EED) y las proteínas de unión a histonas RBAP46/ RBAP48 [Kuzmichev *et al.*, 2002]. Algunas de estas sub-unidades regulan a EZH2, por ejemplo EED es una proteína que contiene un dominio repetido WD40, compuesto de triptofano y aspartato que favorece la interacción proteína-proteína, de la cual además existen diferentes isoformas. Cada una de estas isoformas le confieren a EZH2 especificidad por su sustrato [Nekrasov *et al.*, 2005]. Así mismo, recientemente se descubrió que SUZ12 ocupa una porción importante de promotores de genes necesarios para la diferenciación de las células troncales, donde además se demostró la incorporación de la variante de histona H2A.Z. De esta manera se estableció que la colocación de las proteínas, EZH2 y SUZ12 con la variante H2A.Z resulta en la formación de cromatina especializada con una señalización epigenética específica, necesaria para la ejecución apropiada de los programas de expresión durante el desarrollo [Creyghton *et al.*, 2008].

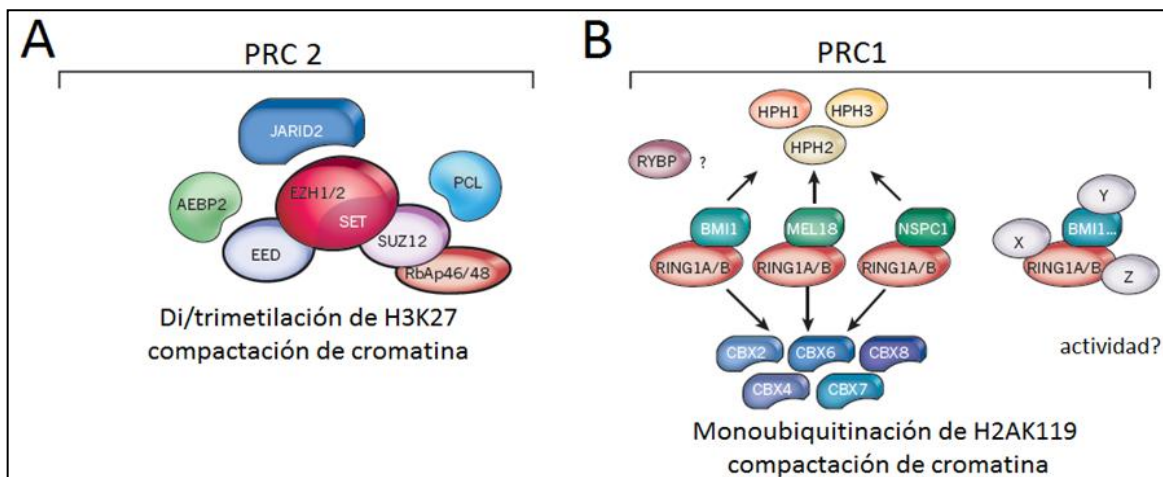


Figura 8. Representación gráfica de los componentes peptídicos que conforman a los complejos represores Polycomb. **A-** Proteínas que conforman el núcleo de **PRC2**. **RBAP46/48:** Proteína de unión a Retinoblastoma, también conocida como NURF55 o RBBP. **SUZ12:** Supresor de zeste. **EED:** Proteína del desarrollo embrionario del ectodermo. **EZH2:** “Enhancer” de zeste homólogo 2. **B-** Proteínas de PRC1. **RING1:** Proteína 1 con dominio “ring finger”. **HPH:** Proteína homóloga de “polyhomeotic”. **CBX:** Proteína homóloga “chromobox”. **BMI1:** “BMI1 polycomb ring finger oncogene”. Modificado de Margueron y Reinberg, 2011.

1.3.5.2. Complejo de mantenimiento o complejo represor Polycomb 1 (PRC1)

En mamífero, las cuatro subunidades que forman el núcleo de PRC1 son PHC, CBX, BMI1 y RING1 que en *Drosophila melanogaster* son los homólogos de Ph, Pc, Psc, y dRing, respectivamente (Figura 8). Así mismo, en mamíferos hay al menos cuatro parálogos de la proteína con dominio “Ring finger” Psc, que son: BMI1, Mel18, MBLR y NSPc1. Un aspecto relevante es que éstas interactúan con otras proteínas PcG para formar subtipos de complejos PRC1, por ejemplo NSPc1 y RING1B son parte del complejo represor BCOR [Gearhart *et al.*, 2006], mientras que MBLR y RING1B están

relacionados con E2F6 con funciones represoras [Ogawa *et al.*, 2002]. Cabe resaltar que la importancia de que se formen diferentes sub-complejos de PcG radica en que de esta manera se asegura una diversificación de blancos de Polycomb. En la Tabla 2 se describen más funciones de cada una de estas proteínas.

Otra de las actividades que se le han atribuido al complejo PRC1 y sus variantes, es la actividad monoubiquitinación de la lisina 119 de la histona H2A (H2AK119Ub), una modificación relacionada con cromatina cerrada o compacta que contribuye a reafirmar el proceso de silenciamiento. Aunque existen cuatro proteínas del complejo PRC1 con dominios “Ring finger”, se ha demostrado que solo RING1A y RING1B llevan a cabo la ubiquitinación de proteínas histonas [Buchwald *et al.*, 2006] y la auto-ubiquitinación para su propia regulación [de Bie *et al.*, 2010]. También se sabe que RING1B participa en la regulación de genes que controlan la embriogénesis, el desarrollo y la inactivación del cromosoma X, donde una de las modificaciones características es la H2AK119ub1. Además, existen evidencias que sugieren que esta participación puede ser vía ARNs no-codificantes [de Napoles *et al.*, 2004; Schoeftner *et al.*, 2006; Alder *et al.*, 2010].

Por otra parte, datos bioquímicos sugieren que la familia de proteínas CBX, homólogos de la proteína Pc de *Drosophila*, las cuales contienen un cromodominio, son clave para la función del complejo PRC1 dado que reconocen y se unen diferencialmente a las histonas con las marcas H3K27me3 y H3K9me3. En consecuencia, esta acción

contribuye a destinar a los complejos PRC1 a diferentes blancos de acción y así mantener el silenciamiento iniciado en estas regiones [Bernstein *et al.*, 2006].

Dada la relevancia de PcG y la creciente participación de los ARNs no-codificantes en la mayoría de los procesos celulares, es importante resaltar que tanto PRC1 como PRC2 pueden interactuar con estos ARNs no-codificantes y facilitar su reclutamiento a sus sitios blanco. Recientemente se ha demostrado que SUZ12 interactúa con el ARN no-codificante llamado HOTAIR [Hung y Chang, 2010] y que EZH2 interactúa a través de un dominio específico identificado recientemente llamado ncRBD1 [Kaneko *et al.*, 2010]. Así mismo, se demostró que un complejo EED-EZH2 se une al ARN no-codificante *Kcnq1ot1* para silenciar regiones específicas del genoma durante el desarrollo embrionario [Wu y Bernstein, 2008]. Como vemos, cada vez es más evidente la participación de los complejos Polycomb y Thritorax mediando la actividad de los ARN no-codificantes.

En conclusión, resulta importante resaltar la existencia de diferentes combinaciones oligoméricas de los complejos Polycomb que son atraídos a sus sitios blanco a través de diferentes factores de transcripción como los que se mencionan aquí, en particular E2F6 o incluso por ARNs no-codificantes, confiriendo al grupo PcG su especificidad y diversidad de blancos involucrados en una amplia gama de procesos celulares.

1.3.5.3. El mecanismo de acción de los complejos Polycomb

En mamíferos, a diferencia de lo que ocurre en *Drosophila*, ninguna de las proteínas del complejo PcG tiene dominio de unión al ADN, por lo que el complejo PRC2 necesita ser reclutado a su sitio blanco. Existen varios estudios donde se relaciona a proteínas como el factor Yin Yang (YY1), OCT4, SOX2 y NANOG y distintos co-factores asociados como potenciales reclutadores del complejo PcG [Thomas y Seto, 1999; Caretti *et al.*, 2004], sin embargo los datos bioquímicos son insuficientes para asignarles de manera general el papel de reclutadores de los complejos Polycomb. Como se mencionó antes, la relación de PcG que ha sido mejor investigada es la que ocurre con el factor E2F6. Se sabe que E2F6 puede atraer a sus sitios blanco a los miembros de PcG: BMI1, RING1A, RING1B y EPC1-EZH-2 [Oberley *et al.*, 2003; Attwooll *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2007].

En la Figura 9 se muestran algunos de los mecanismos de acción de Polycomb descritos en *Drosophila* que nos pueden dar una idea de lo que podría ocurrir también en mamíferos u otras especies.

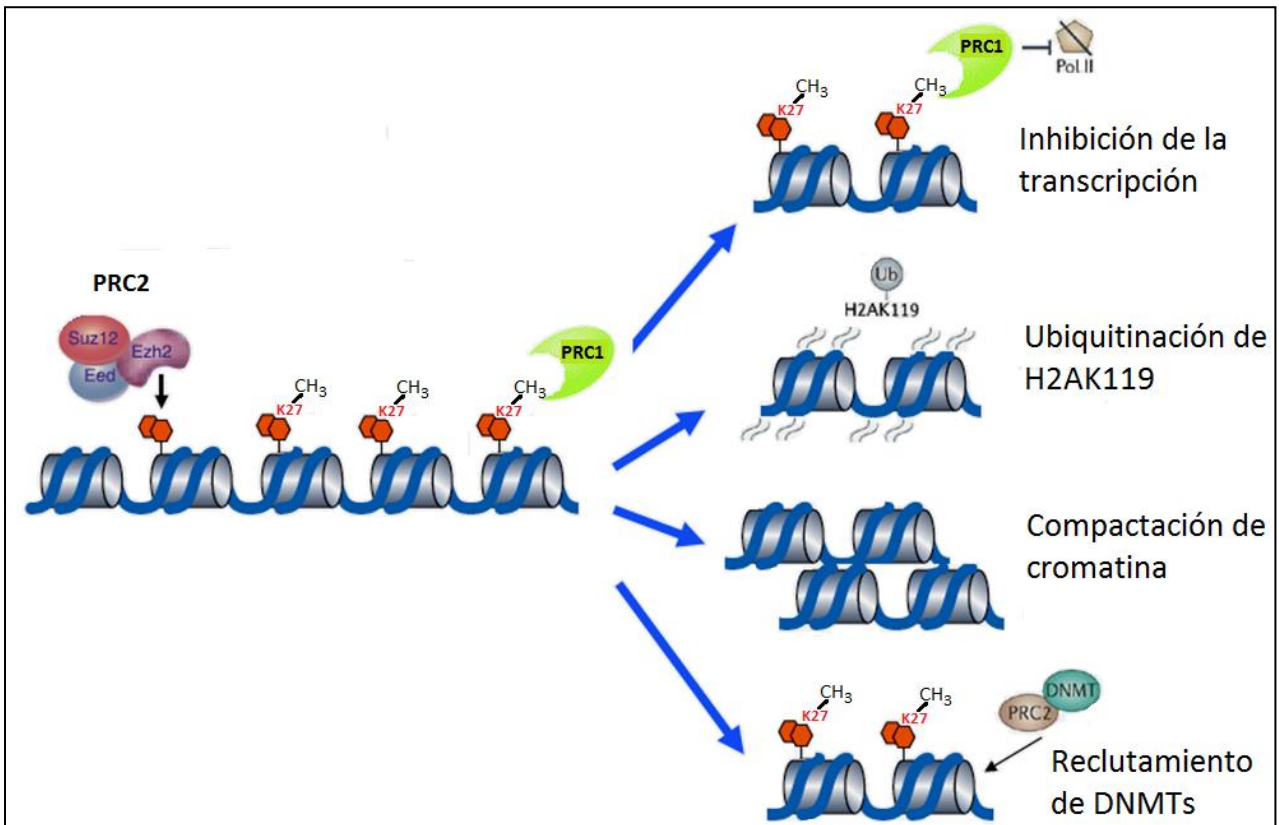


Figura 9. Complejos Polycomb PRC2 y PRC1 y los mecanismos de acción propuestos. El complejo PRC2 es el primero en reconocer su sitio de acción y a través de la metilasa de histonas EZH2, modifica la lisina 27 de la histona H3. Esta marca es reconocida por el complejo PRC1, lo cual puede desencadenar cuatro respuestas distintas. Inhibición de la transcripción, por interferencia física no se puede asociar la polimerasa II a su sitio de acción. PRC1 promueve la ubiquitinación de la lisina 119 de la histona H2A, la cual refuerza el silenciamiento por el reclutamiento de proteínas como HP1 y DNMTs, lo que eventualmente genera cromatina más compacta. Modificado de Sparmann y van Lohuizen, 2006

Finalmente, no se sabe o aún no se tiene claramente definido el dominio de interacción entre E2F6 y PcG, pero es muy atractivo pensar o sugerir que PcG también pueda unirse a otros miembros de la familia E2F, dada la similitud entre la familia de factores E2F. Lo cual ayudaría a explicar la participación temporal del grupo PcG en

diversos procesos específicos durante el desarrollo y la diferenciación celular, así como en el desarrollo de patologías. En particular, por información en la literatura y por datos experimentales generados en nuestro laboratorio, sabemos que E2F6 se une al promotor del gen *Rb* y reprime su actividad [Dávalos-Salas *et.al.*, datos no publicados], por tal razón, hemos pensado que E2F6 puede ser un fuerte candidato reclutador de PcG hacia sus blancos de acción, por ejemplo, a genes supresores de tumores y contribuir de esta manera a la desregulación génica fundamental en el desarrollo de procesos carcinogénicos.

Tabla 3. Funciones de las Proteínas Polycomb en *Drosophila* y humano y los complejos que forman.

Subunidades de PcG en <i>Drosophila melanogaster</i>	Subunidades de PcG en humanos	Complejo al que pertenecen	Dominios identificados en la proteína	Funciones bioquímicas
Polycomb	CBX2 (PC1), CBX4 (PC2), CBX6, CBX7 y CBX8 (PC3)	PRC1	Cromodominio y dominio 'shadow'	Se une a la H3K27 trimetilada
Polyhomeotic	PH1 y PH2	PRC1	Dominio SAM y dedos de zinc C2-C2	Interacciones de alto orden
Posterior Sex combs	BMI1, MEL18 (PCGF2) y NSPC1 (PCGF1)	PRC1	Dedos RING (dedos de zinc C3HC4)	Cofactor de la enzima E3 ubiquitina ligasa y ayuda a compactar polinucleosomas
Sex combs extra	(RING) RING1 y RING1B (RNF2)	PRC1	Dedos RING (dedos de zinc C3HC4)	Enzima E3 ubiquitina ligasa de la H2AK119
Enhancer of Zeste	EZH1 y EZH2	PRC2	Dominio SET, dominio CXC y dominios de homología I y II	Histona metiltransferasa con especificidad para la H3K27
Suppressor of Zeste 12	SUZ12	PRC2	Dedos de zinc C2-H2 y dominio VEFS	Estimula a la Histona metiltransferasa con especificidad para la H3K27
Extra Sex combs and Extra Sex combs-like	EED (variants con diferentes extremos amino-terminal)	PRC2	Repetidos WD	Estimula a la Histona metiltransferasa con especificidad para la H3K27
Nucleosome remodelling factor 55 (p55 and CAF1)	RBAP48 (RBBP4) y RBAP46 (RBBP7)	PRC2	Repetidos WD	Se una a las histonas
Polycomb-like	PHF1 (PCL1), MTF2 (PCL2) y PHF19 (PCL3)	Une a PRC2	Dos dedos PHD y un dominio Tudor	Estimula la trimetilación de H3K27 y recluta a PRC2

[Modificado de Simon y Kingston, 2009]

1.3.6. La organización y dinámica nuclear

El conocimiento referente a la organización cromosomal proviene principalmente del estudio de la estructura altamente condensada y transitoria de cromatina que es el cromosoma metafásico. Sin embargo, las funciones básicas en el núcleo de células eucariontes tales como duplicación del ADN, transcripción y procesamiento del ARN e incluso la traducción perinuclear ocurren principalmente en un núcleo en interfase [Iborra *et al.*, 2001; Spector, 2003]. La organización y dinámica nuclear interfásica son aspectos que recientemente se han tomado en consideración como parte integral de los mecanismos de regulación de la expresión génica [Folle, 2008].

El núcleo en interfase es un organelo altamente organizado y compartimentalizado. En este organelo los cromosomas ocupan territorios discretos en un espacio tri-dimensional en asociación con varias proteínas regulatorias presentes en cuerpos nucleares específicos que pueden difundir a través del nucleoplasma (Figura 10) [Spector, 2003]. Los cuerpos nucleares como las motas o gránulos intercromatinicos, los cuerpos de Cajal, los cuerpos de leucemia promielocítica o PML, por sus siglas en inglés, y el compartimiento perinucleolar se encuentran en el espacio intercromatiniano entre los territorios cromosómicos [Spector, 2003]. Todas estas estructuras son “regiones” o sub-organelos nucleares de composición definida con funciones específicas [Croft *et al.*, 1999; Tanabe *et al.*, 2002]. Así mismo, hay evidencia que sugiere que los territorios cromosómicos no son compartimientos rígidos. De hecho, se ha propuesto que

diferentes territorios se sobrelapan y que esta interacción entre ellos, parece ser dependiente de la activación transcripcional específica [Branco y Pombo, 2006].

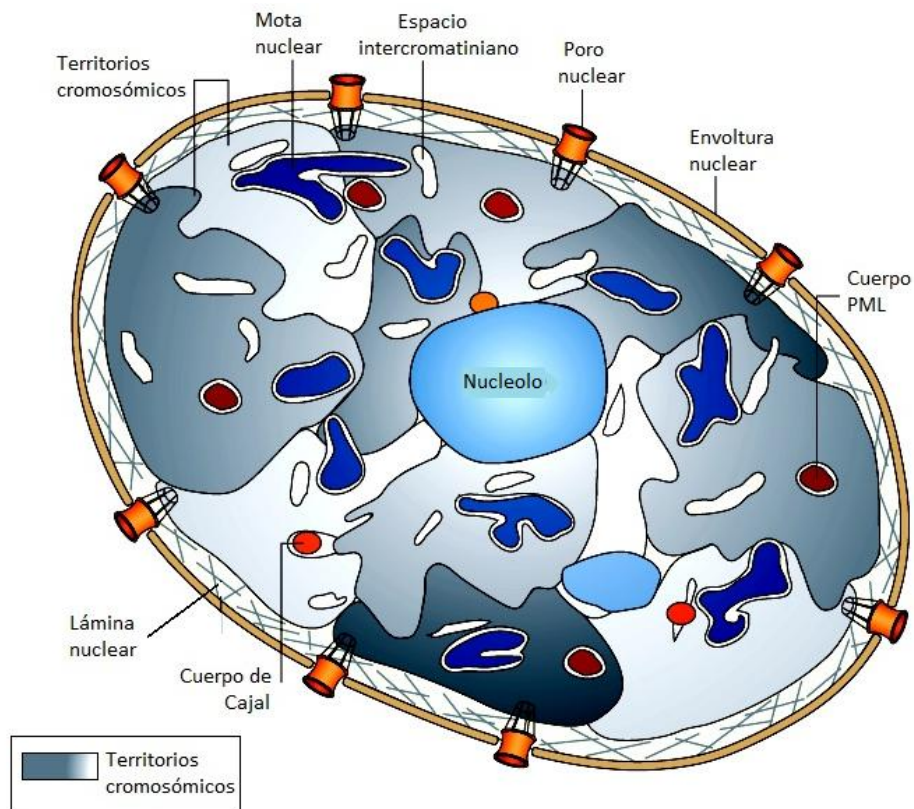


Figura 10. Representación esquemática simplificada de la organización nuclear. Se muestran algunas estructuras nucleares como el nucléolo, los territorios cromosómicos que son sitios discretos donde se localizan cromosomas específicos, cuerpos de Cajal, cuerpos PML, motas nucleares las cuales son compartimientos dinámicos enriquecidos de ARNpre-mensajero y factores de procesamiento (splicing) que se localizan en el espacio intercromatiniano. También se muestran los poros nucleares y la envoltura nuclear. Este arreglo comosómico se ha visto que es característico para cada tipo celular y depende de la etapa de desarrollo o diferenciación en la que se encuentre Modificado de Lanctôt *et al.*, 2007.

Sin embargo, contrario a lo que sucede en plantas, levadura y *Drosophila*, donde, durante la interfase los telómeros y centrómeros se localizan en lados opuestos en el núcleo, en los vertebrados los cromosomas muestran un arreglo radial. Y se ha visto que esta organización no es aleatoria, no obstante se han reportado variaciones según el linaje celular, si las células están quiescentes o ya comprometidas a un linaje celular específico. Así mismo, se ha demostrado que los cromosomas ricos en genes tienden a ubicarse en la región más central del núcleo mientras que los cromosomas pobres en genes residen mayoritariamente en la periferia nuclear adosados a la envoltura nuclear y en un contexto de heterocromatina [Cremer y Cremer, 2001; Cremer *et al.*, 2003; Bolzer *et al.*, 2005]. Este posicionamiento de los cromosomas y por ende de los genes, se ha conservado durante la evolución. En un ejemplo específico se demostró que dos cromosomas con diferente densidad génica, el cromosoma 18 y el 19, se localizan en diferentes regiones dentro del núcleo [Croft *et al.*, 1999; Tanabe *et al.*, 2002]. Por tal razón, se ha propuesto que la secuencia del ADN y las modificaciones asociadas a la cromatina pueden estar íntimamente involucradas con los patrones de localización de los cromosomas en el núcleo durante la interfase [Cremer y Cremer, 2001]. En consecuencia, debido a la compleja compartimentalización y organización nuclear, una parte importante de la investigación actual se ha enfocado en tratar de entender y caracterizar las interacciones dinámicas entre la cromatina y cada una de estas estructuras, además de comprender su impacto sobre la transcripción y el procesamiento de mensajeros [Kumaran *et al.*, 2008].

Como se ha mencionado, cada vez existen más evidencias de que la desregulación de uno o varios de los mecanismos epigenéticos mencionados en las secciones anteriores, están íntimamente involucrados con el desarrollo de enfermedades complejas como por ejemplo: cáncer. Por tal motivo, se abordarán a continuación algunas evidencias de esta estrecha relación.

1.4. El Cáncer: un enemigo silencioso

El cáncer es un problema de salud pública, no solo en México sino a nivel mundial, que día con día ocasiona miles de fallecimientos principalmente en países poco desarrollados económicamente. Las estadísticas a nivel mundial señalan que en mujeres, el cáncer de mama representa el 23 % de todos los casos de cáncer y el 14 % del total de defunciones por cáncer. Para el caso de los hombres, el cáncer de pulmón representa el 17 % del total de casos de cáncer y el 23 % de defunciones por cáncer [Jemal *et al.*, 2011]. En la actualidad existen cientos de grupos multidisciplinarios invirtiendo una gran cantidad de recursos para el estudio de la etiología y patogénesis de la enfermedad y estudios básicos como el presente trabajo de tesis, son indispensables para poder llegar a entender los mecanismos de la enfermedad.

El cáncer se define como el crecimiento tisular producido por la proliferación descontrolada y continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos. Esta patología, que puede originarse a partir de cualquier tipo de célula, se define como un conjunto de enfermedades que se clasifican en función del tejido y célula de origen. El cáncer involucra la acumulación de cambios en el genoma o mutaciones que conducen a la activación de oncogenes y a la inhibición de genes supresores de tumores [Hanahan y Weinberg, 2000]. Basándose en observaciones de cáncer humano y en modelos animales, se puede decir que el desarrollo de un tumor proviene de un proceso de múltiples etapas análogo a la evolución Darwiniana, en el cual una sucesión de cambios genéticos, desde mutaciones puntuales hasta cambios en el complemento cromosómico, confieren algún tipo de ventaja para el crecimiento celular descontrolado, lo que conduce a la transformación progresiva de células normales en células cancerosas malignas (Figura 11) [Bergers *et.al.*, 1999; Hanahan y Weinberg, 2000]. Es decir, generalmente una sola mutación no basta para convertir una célula normal en una célula cancerosa, por el contrario, se ha visto que la carcinogénesis (la generación del cáncer) requiere de la acumulación de varias alteraciones en el linaje de una célula [Alberts *et.al.*, 2002]. Estos cambios pueden ser provocados por diferentes clases de agentes, como pueden ser: **(a)** carcinógenos, que entre otras lesiones provocan cambios en la secuencia nucleotídica; **(b)** radiación, que generalmente causa rupturas en los cromosomas y translocaciones; **(c)** virus, que introducen versiones oncogénicas de genes que afectan el control del ciclo celular [Alberts y *et.al.*, 2002]; y

más recientemente, (d) alteraciones en la regulación epigenética que incluyen cambios en los patrones de metilación (hipo e hipermetilación) y modificaciones post-traduccionales de las histonas que modifican la expresión génica, ARN no-codificantes como HOTAIR, entre otros [Feinberg, 2004; Guasconi *et al*, 2004; Lund y van Lohuizen, 2004; Baylin y Ohm, 2006; Martínez y Cavalli, 2006; Jones y Baylin, 2007].

Así mismo, se ha sugerido que los diferentes genotipos de células cancerosas son una manifestación de alteraciones esenciales en la fisiología celular que colectivamente dirigen el crecimiento celular maligno, dichas alteraciones son (Figura 11):

- 1) Autosuficiencia en señales de crecimiento,
- 2) Insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento,
- 3) Evasión de la muerte celular programada o apoptosis,
- 4) Potencial replicativo ilimitado,
- 5) Angiogénesis continua e invasión de tejidos adyacentes y
- 6) Metástasis,
- 7) Estrés en múltiples niveles y
- 8) Evasión de la vigilancia del sistema inmune [Hanahan y Weinberg, 2000, 2011].

Aunque no se ha demostrado que estas alteraciones sigan un orden de aparición determinado, sí se sabe que es necesario que todas, excepto la metástasis, ocurran para que se genere una célula cancerosa.

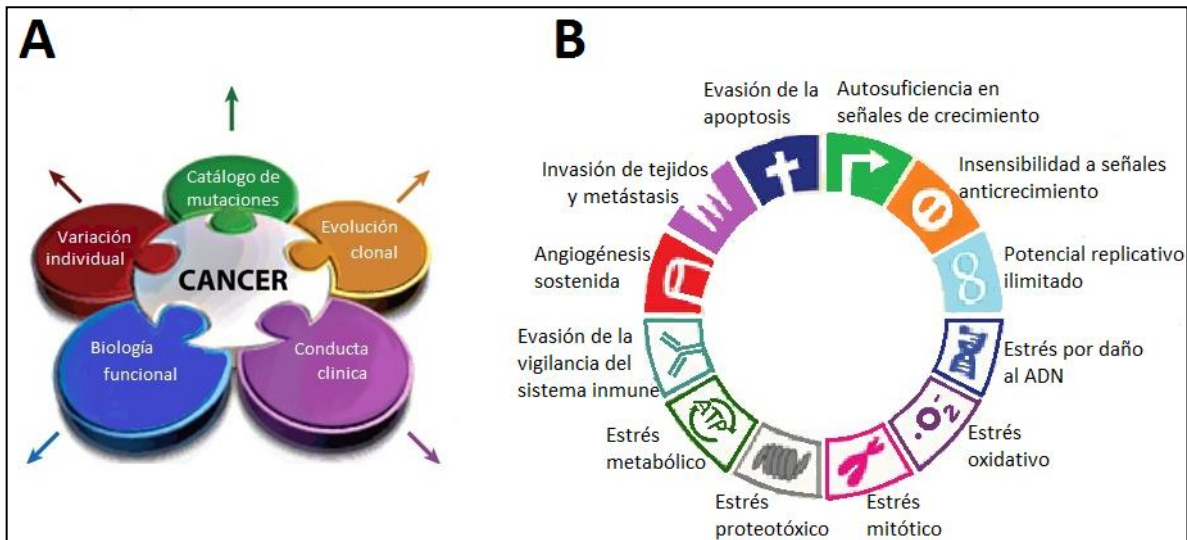


Figura 11. Cambios genómicos y cáncer. **A-** Aspectos que actualmente son considerados para el diseño del óptimo tratamiento del cáncer. **B-** Capacidades adquiridas por las células transformadas las cuales les confieren ventajas en su entorno. Modificado de Cowin, 2010 y Hanahan y Weinberg, 2011.

Hace más de un siglo que se sugirió que la segregación de defectos genéticos predispone a algunos individuos a padecer cáncer, pero no es sino hasta hace dos décadas, con el desarrollo de las tecnologías de la biología molecular, que se han identificado genes asociados con el desarrollo de cáncer. Entre dichos genes se encuentran los oncogenes (que codifican proteínas con ganancia dominante de función) y los genes supresores de tumores (que codifican proteínas con pérdida recesiva de función) y ambas clases de genes fueron descubiertos principalmente por su alteración en la mayoría de los cánceres humanos. Gran parte del conocimiento actual de estos genes fue generado por estudios bioquímicos y funcionales hechos en células en cultivo, sin embargo, la información generada recientemente que explica como la función

anormal de estos genes contribuye al desarrollo del cáncer humano, proviene principalmente del trabajo con modelos animales. No obstante, como veremos más adelante, no todas las alteraciones celulares ocurren por causa genéticas, sino que hay además componentes epigenéticos ampliamente involucrados y cabe puntualizar que ninguno de los dos aspectos es excluyente.

1.4.1. Oncogenes

A mediados de los años 70s era difícil encontrar virus tumorales como la única explicación para la aparición de la mayoría de los cánceres humanos, por lo que se postuló la teoría de que los compuestos carcinógenos actuaban también como mutágenos, dañando genes que controlan el crecimiento celular para de esta manera “convertirlos” en oncogenes. Para demostrar esta teoría, se realizó un experimento que consistió en extraer ADN de células transformadas por métodos químicos y se les transfirió a células normales no transformadas (NIH-3T3). Después de un tiempo en cultivo se analizaron estas células y se encontró una gran cantidad de células transformantes, las cuales mostraron tener la capacidad de crecer independiente de adhesión y de ser tumorigénicas. Estos resultados indicaron que las células transformadas químicamente eran portadoras de genes que podían funcionar como oncogenes y que los oncogenes se activan en los genomas de células independiente de

infecciones virales. Experimentos adicionales, utilizando células humanas transformadas como donadoras de ADN y transfectando este ADN en células de murino, demostraron que los oncogenes pueden superar la barrera de tejido y especie para inducir transformación celular. Así mismo, se demostró que ambos tipos de oncogenes, los detectados por los experimentos de transfección y los provenientes de retrovirus transformantes, se derivan de genes celulares normales pre-existentes resultado de mutaciones o alteraciones epigenéticas que consecuentemente modifican los patrones normales de expresión [Klein, 1988; Croce, 2008].

El descubrimiento de los proto-oncogenes y los oncogenes proveyó una explicación de cómo se conduce la proliferación celular [Pimentel, 1985]. En suma, las proteínas codificadas por proto-oncogenes participan de diversas maneras en la recepción y procesamiento de señales estimuladoras del crecimiento que se originan en el medio extracelular. Cuando estos genes sufren una mutación, el flujo de señales promotoras de crecimiento liberadas por estas proteínas se desregula. En lugar de emitir una descarga cuidadosamente controlada, las oncoproteínas liberan un flujo constante de las señales estimuladoras de crecimiento, dando lugar a una incesante proliferación, lo que se asocia con el comportamiento de las células cancerosas [Weinberg, 2007]. No obstante, casi la mitad de los proto-oncogenes identificados a la fecha se han clasificado como factores de crecimiento o como elementos de la maquinaria celular que permiten a los factores de crecimiento transducir las señales en una respuesta celular. En la Tabla 4 se

muestran una clasificación de proto-oncogenes y el producto que codifican [Klein, 1988; Monier, 1990].

Tabla 4. Proto-oncogénes comúnmente activados en cáncer.

Categoría	Proto-oncogen (ejemplo)	
Factores de crecimiento	Int-2, hst, fgf-5, sis	
Receptores de factores de crecimiento	Con actividad cinasa	Erb-B2, fms, met, trk
	Hormonales	mas, erb-A
Proteínas con actividad cinasa	Membranales	src, yes, fes, fps, abl, lck
	Citoplásmicas	mos, raf
Proteínas transductoras de señales	Ha-ras, Ki-ras, N-ras	
Oncogenes nucleares	myc	
Factores de transcripción	fos, myb, jun	

Modificado de Monier, 1990

1.4.2. Genes supresores de tumores

En los años 70s y 80s el estudio de la genética y el descubrimiento de los oncogenes, ayudó a poner en evidencia la existencia de un segundo tipo de genes que también regulan el crecimiento celular, pero que son fundamentalmente diferentes a los

oncogenes. Estos funcionaban suprimiendo la proliferación celular y por esta característica se les nombró genes supresores de tumores (GST). A lo largo de su estudio se ha demostrado en múltiples ocasiones una correlación entre la inactivación o pérdida de su actividad con el desarrollo de tumores, ya que una vez que la célula ha perdido algún GST se libera de las restricciones de crecimiento y comienza a proliferar de manera descontrolada. Después de tres décadas se ha demostrado experimentalmente que los GST tienen un papel central en la patogénesis del cáncer y que es tan importante como la activación de los proto-oncogenes [Weinberg, 2007]. En la Tabla 5 se muestran algunos ejemplos de GST y el tipo de cáncer al que están asociados.

El primer gen supresor de tumores estudiado fue el gen Retinoblastoma (Rb), el cual es causante de la formación de tumores en la retina que afecta por igual tanto a niños como a adultos, además se ha visto que en el 90% de los casos de cánceres humanos se encuentra desregulada la expresión del gen o la proteína no es sintetizada [Hanahan y Weinberg, 2000; Sherr y McCormick, 2002].

Tabla 5. Genes supresores de tumores comúnmente inactivados en cáncer

GEN	TIPO DE CÁNCER
RB1	Retinoblastoma, carcinoma microcítico pulmonar, carcinoma mamario
TP53	Síndrome de Li Fraumeni
DCC	Cáncer colorectal
MLH1, MSH2, MSH6	Cáncer colorrectal hereditario no poliposo
CDKN2A	Melanoma familiar
ATM	Ataxia telangiectasia; prueba de implicación directa en el cáncer de mama.
CHK2	Cáncer pulmonar, cáncer de mama
DPC4	Poliposis juvenil
APC	Carcinoma de colon/recto
BRCA1	Carcinomas de mama y ovario
BRCA2	Carcinoma de mama
INK4	Melanoma, carcinoma de pulmón, tumores cerebrales, leucemias, linfomas
NF1	Neurofibromatosis-1
NF2	Neurofibromatosis-2
PTCH	Carcinoma de las células basales
PTEN	Tumores cerebrales, melanoma, carcinomas de vejiga, pulmón y mama
Smad2	Carcinoma de colon/recto
Smad4	Carcinoma de colon/recto, carcinoma pancreático
TβRII	Carcinoma de colon/recto, carcinoma gástrico
VHL	Carcinoma de células renales
WT1	Tumor de Wilms

Modificado de Sherr, 2004.

1.4.3. Epigenética y cáncer

Basados en una clara interdependencia entre procesos epigenéticos y genéticos, en los últimos años se han descrito ejemplos en los cuales se sugiere que la inactivación de genes supresores de tumores mediante el silenciamiento epigenético representa un factor crítico para el desarrollo de cáncer [Esteller, 2005]. Así mismo, algunas de las modificaciones epigenéticas más observadas en el cáncer son el incremento anormal de la metilación del ADN en las islas CpG localizadas en los promotores de genes clave. Así como la pérdida de acetilación y cambios en la metilación en residuos específicos en las histonas, la pérdida de función de proteínas remodeladoras de cromatina y la desregulación de ARN no-codificantes importantemente de aquellos que tienen funciones supresoras de tumores u oncogénicas [Jones y Baylin, 2007; Thiagalingam *et al.*, 2003; Esteller, 2005].

La hipótesis que involucra la metilación del ADN en el desarrollo del cáncer surgió hace ya varios años con la hipometilación global del genoma de células tumorales [Riggs y Jones, 1983; Feinberg *et al.*, 2006]. Desde entonces se ha demostrado que mientras la hipometilación del ADN es global, la mayoría de islas CpG están hipermetiladas, es decir, presentan ganancia de metilación [Jones y Baylin, 2007; Miranda y Jones, 2007] y que esta hipermetilación lleva al silenciamiento de genes, incluyendo a los genes supresores de tumores, contribuyendo de esta manera al proceso de tumorigénesis (Figura 4). Aunque todavía no se sabe cómo y porqué ocurre este cambio en los

patrones de la metilación del ADN se han propuesto varias hipótesis para tratar de explicar este fenómeno [Ellis *et al.*, 2009]. Lo relevante aquí es que puede presentarse la ausencia de una proteína asociada al desarrollo del cáncer sin que ocurran mutaciones u otros defectos a nivel genético. Por ejemplo una teoría darwiniana sugiere que esa inactivación particular le provee a la célula ventajas de un crecimiento selectivo [Esteller, 2005; Esteller, 2008]. Otra hipótesis sugiere que los genes que están regulados por la proteínas PcG son más sensibles a ser metilados [Ohm y Baylin, 2007], además se ha propuesto que las DNMTs pueden ser dirigidas erróneamente a promotores específicos por proteínas de fusión generadas a partir de traslocaciones [Di Croce *et al.*, 2002]. Además de lo anterior, diversas líneas de investigación demuestran que la pérdida global de la metilación del ADN correlaciona con diferentes etapas en la progresión del cáncer y con el desarrollo de metástasis en varios tipos de tumor incluyendo los de próstata, cervical, hepatocelular y de cerebro. Por otra parte, se ha propuesto que estos cambios pueden ocurrir en las etapas tempranas o pre-invasivas en el desarrollo de cáncer [Tsai y Baylin, 2011]. Otra área de estudio que ha relacionado a la epigenética con el cáncer es la hipótesis de que la enfermedad se puede desarrollar a partir de células madre adultas, lo cual tomó mucha relevancia por sus implicaciones biológicas y posible potencial terapéutico. En la década pasada se demostró que estas células iniciadoras de cáncer, como también se les llamó, eran resistentes a los tratamientos básicos de quimio y radioterapia. Entonces los estudios en esta área se han enfocado a entender los

cambios epigenéticos que favorecen la expansión clonal de estas células [Ohm y Baylin, 2007; Tsai y Baylin, 2011].

El punto importante que quiero resaltar es que todos estos eventos epigenéticos tienen consecuencias más globales sobre los genes, que las mutaciones por sí mismas. Además el área de la epigenómica del cáncer está enfocada a que, a través del entendimiento de la relación epigenética-cáncer, se puedan identificar, por una parte biomarcadores epigenéticos para el diagnóstico oportuno y por otra se puedan desarrollar terapias o tratamientos a nivel epigenético.

En suma, aunque en Estados Unidos ya está aprobado por la FDA el uso clínico de compuestos inhibidores de la metilación y de las HDACs, aún falta mucho por conocer acerca de los detalles de los mecanismos involucrados en la regulación anormal de la expresión génica, y es en parte el objetivo de este trabajo, contribuir a generar ese conocimiento, en particular estudiando al gen Retinoblastoma desde la perspectiva de la regulación epigenética.

2. EPIGENÉTICA Y RETINOBLASTOMA: ANTECEDENTES PARTICULARES

2.1. La proteína Retinoblastoma (pRb)

La proteína Rb es miembro de la familia de proteínas “pocket” (pRb, p107 y p130) (Figura 12) cuya actividad mejor descrita es la capacidad de reprimir la transcripción de los genes regulados por la familia de factores E2F [Flemington *et al.*, 1993; Helin y Ed 1993; Frolov *et al.*, 2001]. Así mismo, pRb regula la expresión de marcadores de diferenciación celular, de genes cuyo producto peptídico regulan el ciclo celular, coordina programas de expresión génica importantes para que la célula pueda proliferar o diferenciarse. Se ha demostrado que las proteínas pRb son importantes para los procesos de compactación de la cromatina que ocurre durante la mitosis, para la senescencia y la formación y re-organización de heterocromatina. Estos hallazgos apoyan la idea de que los miembros de la familia pRb no solo actúan como factores a nivel del promotor, sino que funcionan de manera más amplia para controlar la organización de la cromatina. El gran número de cambios requeridos en la expresión génica que son necesarios para la transición entre proliferación y diferenciación celular, involucran una extensa reorganización de los dominios cromosómicos. Es muy probable que esto explique el porqué los miembros de la familia pRb actúan como reguladores maestros de la transición en dichos procesos [Longworth y Dyson, 2009].

En la mayoría de las plantas y animales, la función de los miembros de la familia pRb es proveer un freno importante en la actividad de los factores E2F. La ausencia de esta restricción, coloca a las células en un estado permisivo para proliferar y listas para responder a señales que favorecen su proliferación descontrolada. Los miembros de la familia pRb bloquean la transcripción promovida por los factores E2F activadores (E2F1, 2 y 3) y reprimen la transcripción de aquellos genes blanco mediante la formación de complejos con los factores E2F represores (E2F3b, 4 y 5) [Trimarchi y Lees, 2002]. Los miembros de la familia pRb contienen distintos dominios de unión para las proteínas E2F y además para complejos modificadores de la cromatina, lo que hace se recluten diversos tipos de actividades reguladoras a los promotores controlados por E2F [Lee *et al.*, 1998; Rubin *et al.*, 2005]. A la fecha se han reportado más de 100 proteínas que interaccionan con la familia pRb [Morris y Dyson, 2001], entre las que se encuentran proteínas involucradas en la regulación transcripcional, y principalmente la modificación y/o el remodelaje de la estructura de la cromatina [Brehm *et al.*, 1998; Narita *et al.*, 2003; Gunawardena *et al.*, 2007; Litovchick *et al.*, 2007].

Por otra parte, se sabe que el producto del gen *Rb* es un importante blanco de oncoproteínas virales tales como las del adenovirus E1A, el antígeno T SV40 y las proteínas E7 de los papiloma-virus humano [Classon y Harlow, 2002]. Estos hallazgos indican que Rb es un regulador de la proliferación celular. El descubrimiento de que la sobre-expresión de *Rb* ocasionaba que las células fueran arrestadas en la fase G1 del

ciclo, mientras que las células deficientes de pRb mostraban una acelerada transición a través de la fase G1, apoyó fuertemente la idea de que el gen *Rb* era un inhibidor del ciclo celular [Classon y Harlow, 2002].

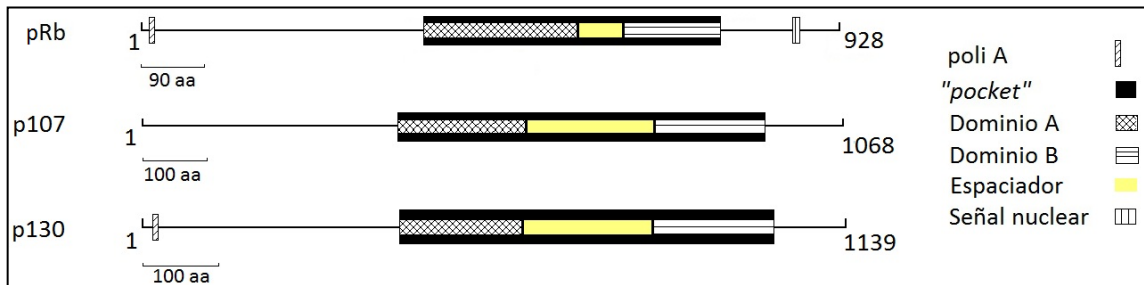


Figura 12. Familia de proteínas "pocket" En el esquema se muestran las proteínas pRb, p107/RbL1 y p130/RbL2 con los dominios identificados en cada una de ellas y el tamaño de la proteína completa. Las tres proteínas comparten varias características entre sí, por ejemplo, los dominios A y B son sitios para mutaciones frecuentes.

La principal regulación de la actividad de la proteína pRb es mediante la fosforilación, especialmente la efectuada por el complejo cinasa 4/6 dependiente de ciclina y la ciclina D. Sin embargo, ahora se sabe que pRb puede ser fosforilada por la proteína cinasa de control 2 (Chk2) en respuesta al daño al ADN [Inoue *et.al.*, 2007]. Así mismo, la actividad de pRb también es regulada por acetilación, la cual puede inhibir su fosforilación [Nguyen *et.al.*, 2004], por sumoilación [Ledl *et. al.*, 2005], ubiquitinación [Ying y Xiao, 2006] y más recientemente se ha demostrado que también por metilación [Saddic *et.al.*, 2010]. Todas estas modificaciones tienen consecuencias tanto en los

niveles de proteína como en la afinidad de unión de pRb con otras proteínas (E2F, modificadores de cromatina como las metil-transferasas, entre otras) (Figura 13). Estas observaciones han sugerido que similar al “código de histonas” también existe un “código de modificaciones transcripcionales” que pueden definir mecanismos o vías de cómo se afecta la función de reguladores clave de la transcripción, tales como la proteína pRb. De hecho se ha demostrado que puede existir un vínculo directo entre estos dos códigos, por ejemplo la mono-metilación del residuo de lisina 860 de la proteína pRb favorece la interacción con la proteína que reconoce y se une a proteínas metiladas, llamada L3MBTL1, la cual se une a histonas metiladas y que previamente se había demostrado correlaciona con la estructuración de cromatina compacta y con la represión de la transcripción génica [Bonasio *et.al.*, 2010].

En resumen, la visión conservadora de que las proteínas tienen una única función establecida, se ha vuelto obsoleta debido a que se han descrito nuevos niveles y sub-niveles de regulación transcripcional y post-traducciona. En particular, me refiero a la contribución de la regulación epigenética a la actividad de *Rb* en procesos celulares anormales como los que ocurren en el cáncer.

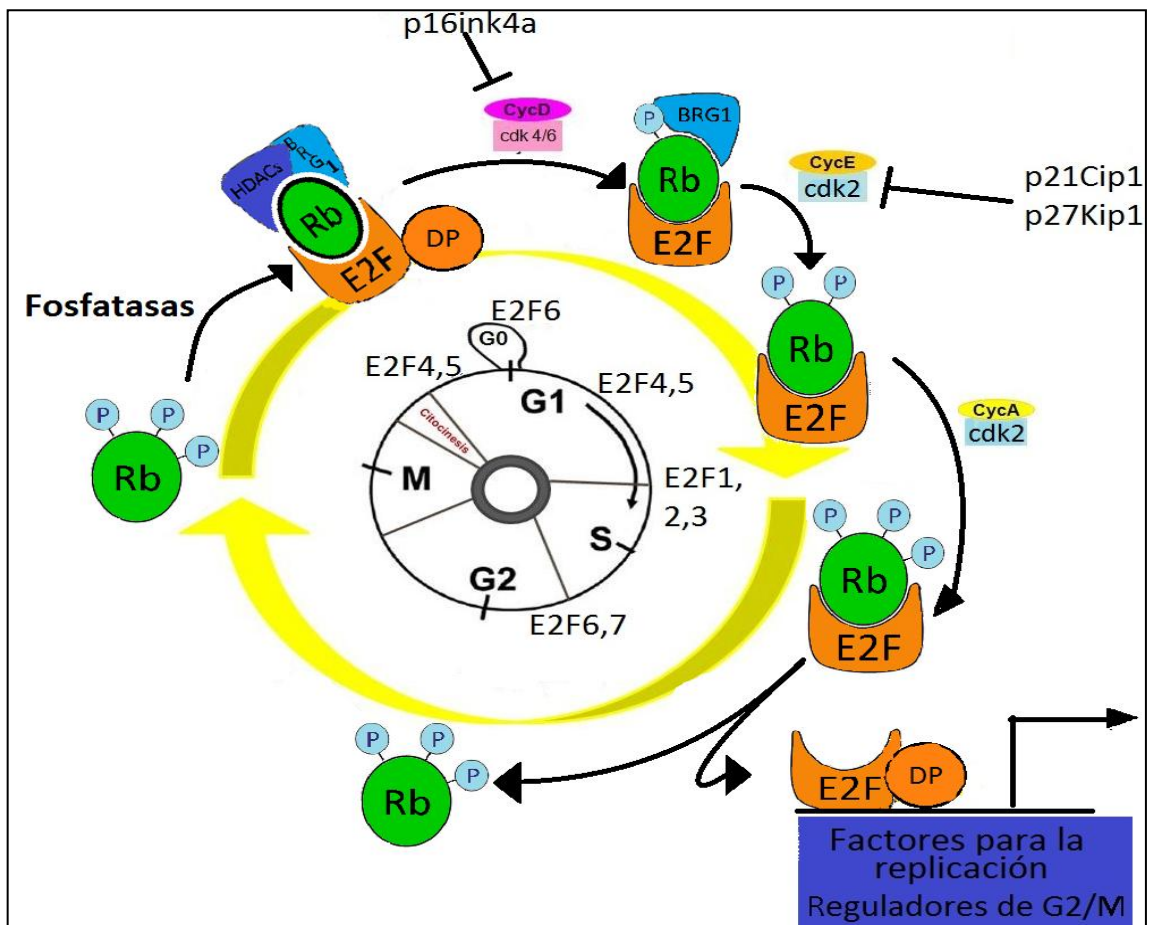


Figura 13. Esquema de la vía p16^{INK4a}/Rb en el ciclo celular y la participación de los factores E2F en cada fase. En la figura central se muestran las fases del ciclo celular y los factores E2F, tanto activadores como represores, presentes en cada fase. En la figura externa se muestra la dinámica de disociación, vía fosforilación/defosforilación del complejo HDACS-BRG1-Rb-E2F/DP a través de las fases del ciclo celular. DP: proteína compañero de dimerización, HDACS: Des-acetiladas de histonas, BRG1: Proteína del complejo remodelador dependiente de ATP SWI/SNF.

2.2. El gen Retinoblastoma humano (*Rb*)

Los miembros de la familia de Retinoblastoma *Rb*, *RbL1/p107* y *RbL2/p130*, son genes supresores de tumores involucrados en el control de importantes procesos celulares tales como: progresión del ciclo celular especialmente en la transición de la fase G1-S, apoptosis, senescencia, diferenciación y angiogénesis. El gen Retinoblastoma (*Rb*) fue el primer gen supresor de tumores descrito [Vogelstein y Kinzler, 2004]. En la figura 14 se muestra la organización genómica del gen *Rb* así como los genes adyacentes a *Rb* y las islas CpG asociadas. Las mutaciones y deleciones de este gen se han asociado con un gran número de cánceres hereditarios, principalmente con el tumor pediátrico Retinoblastoma [Harbour y Dean, 2000]. El tumor Retinoblastoma en niños es una enfermedad genética y en adultos ocurre de forma esporádica. Para explicar el carácter hereditario de la enfermedad, Alfred Knudson propuso a partir de un estudio estadístico robusto que se produce un primer evento o “primer hit” que puede ocurrir en la línea germinal el cual inactiva uno de los dos alelos del gen. Y que la pérdida del segundo alelo “segundo hit” debe ocurrir en un tejido somático para que ahí se desarrolle el tumor [Knudson, 1978]. En suma, la hipótesis de Knudson establece que el cáncer es resultado de mutaciones acumuladas en el ADN de ambos alelos. En el año 2000 McLeod propuso que tanto el primero como el segundo “hit” podrían no solo ser pérdidas genéticas, si no también epigenéticas, y esto ayudó a explicar aquellos casos en los que no se halló ninguna mutación u otra alteración genética en el cuerpo del gen y

aún así se observaba la pérdida de la función supresora de tumores [Knudson, 1978; Lee *et al.*, 1987; Weinberg, 1991].

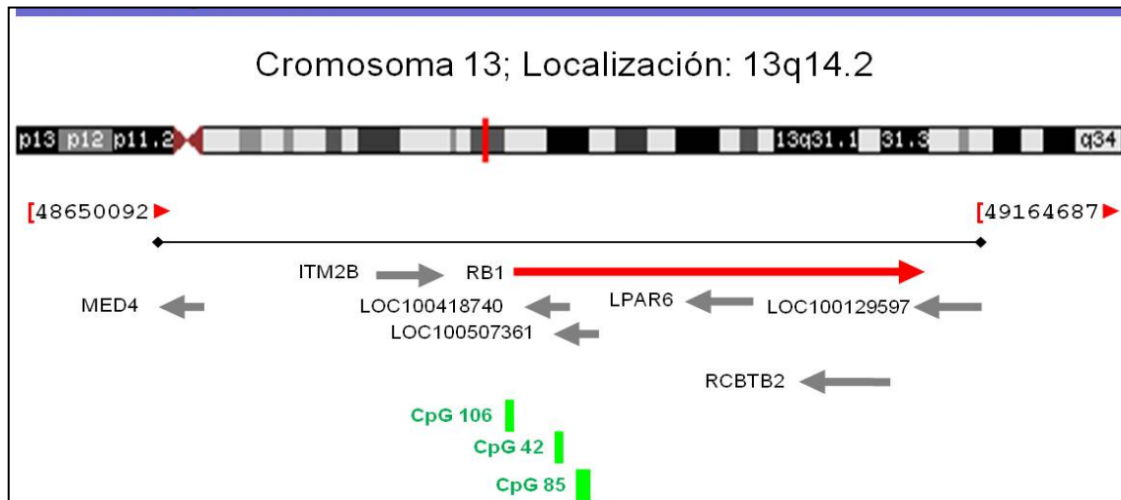


Figura 14. Paisaje genómico del gen *Rb*. Se muestra de arriba hacia abajo la localización genómica de *Rb* y genes adyacentes y las islas CpG asociadas al gen. CpG 106 correspondiente al promotor y CpG 42 y 85 localizadas en el cuerpo del gen, las cuales también tienen funciones regulatorias [modificado de <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>].

2.2.1. Regulación epigenética del gen *Rb*

Recientemente se ha demostrado que en la patogénesis del cáncer humano participan diferentes mecanismos de inactivación de los miembros de la familia de *Rb* [Masciullo *et al.*, 2000; Scambia *et al.*, 2006]. Por ejemplo, se ha visto que en distintos tipos de cánceres ocurren alteraciones epigenéticas como ganancia o pérdida de la

metilación en el ADN y patrones alterados de las modificaciones de histonas que reprimen la expresión génica [Baylin y Ohm, 2006; Feinberg *et al.*, 2006]. Así mismo, estudios previos del promotor del gen *Rb*, realizados en nuestro grupo de investigación, han demostrado que *Rb* puede ser silenciado de manera anormal por mecanismos epigenéticos [Recillas-Targa *et al.*, 2006; De La Rosa-Velázquez *et al.*, 2007; Recillas-Targa *et al.*, 2011 en prensa].

Estos resultados nos han llevado a estudiar más a fondo los mecanismos del silenciamiento epigenético de *Rb*. En particular, en el presente trabajo nos enfocamos al estudio del silenciamiento epigenético vía metilación del ADN en distintos contextos, es decir, en líneas celulares estables con el promotor del gen *Rb* mutado generadas en el laboratorio y líneas celulares de algunos gliomas.

2.2.1.1. Antecedentes del factor nuclear CTCF

El factor CTCF, por sus siglas en inglés “CCCTC-binding factor”, es una proteína de 727 aminoácidos. Su estructura secundaria está dividida en tres dominios distintos: una región amino-terminal, una región central que contiene once dedos de zinc que tienen la capacidad de unirse al ADN y una región carboxilo-terminal. Inicialmente, se identificó al factor CTCF como un represor transcripcional de los genes *c-Myc* y de la *Lisozima* en pollo [Lobanenkov *et al.*, 1990] y se sabe que se encuentra conservado desde *Drosophila*

hasta humano [Ohlsson *et al.*, 2001]. Adicionalmente, se ha demostrado que esta proteína cuenta con más de veinte mil sitios de unión en el genoma humano [Jothi *et al.*, 2008].

Debido a que CTCF tiene la capacidad de interactuar con diversas proteínas y puede unirse a diversas secuencias en el ADN, a través del uso de diferentes combinatorias de sus dedos de zinc, se ha propuesto que es un factor multivalente [Ohlsson *et al.*, 2001, 2010]. Razón por la que CTCF está involucrado en diversas funciones tales como bloqueador de “enhancers”, inactivación del cromosoma X, impronta genómica y regulador de la expresión génica a través de diferentes mecanismos. [Ohlsson *et al.*, 2001, 2010].

La función mejor conocida de CTCF es en el caso del locus *Igf2/H19*, donde se une a una región llamada ICR, por sus siglas en inglés “Imprinting Control Region”. La activación de los genes *Igf2* y *H19* es diferencial y se ha demostrado que depende del estado de metilación del ICR en el alelo materno. Cuando CTCF está unido al ICR, el “enhancer” localizado río debajo de éste es bloqueado y no es capaz de trans-activar al gen *Igf2* localizado río arriba del ICR mientras que trans-activa al gen *H19*. En el alelo paterno en cambio, el ICR se encuentra metilado, CTCF no está unido y ahora el “enhancer” es capaz de trans-activar la expresión del gen *Igf2*. Este es el ejemplo más claro de la participación de CTCF en la regulación de un locus improntado y de la

incapacidad de éste a unirse a su sitio blanco cuando el ADN se encuentra metilado [Phillips y Corces, 2009]. Así mismo, se ha reportado que CTCF participa en la regulación de la actividad de genes involucrados en el control del ciclo celular y el desarrollo, lo que apoya la participación de CTCF en el inicio y la progresión del cáncer [Phillips y Corces, 2009; Witcher y Emerson, 2010].

Finalmente, observaciones originales realizadas en nuestro laboratorio han demostrado la participación de CTCF como un nuevo regulador del gen *Rb* que contribuye a mantener su actividad transcripcional [De La Rosa-Velázquez *et al.*, 2007].

2.2.1.2. Metilación del ADN

Como ya se mencionó, la metilación ocurre en las citosinas de los dinucleótidos CpG y está asociada con un estado cromatínico reprimido y con inhibición de la expresión génica [Filion *et al.*, 2006]. El elemento mínimo del promotor del gen *Rb* humano está constituido por una isla CpG con 27 dinucleótidos CG los cuales se ha demostrado tanto *in vivo* como *in vitro*, que pueden ser metilados contribuyendo a la formación de cromatina represora con un efecto silenciador sobre la transcripción del gen [De La Rosa-Velázquez *et al.*, 2007].

Por otra, sabemos que el mecanismo de silenciamiento está mediado por proteínas capaces de reconocer y unirse a CpGs metilados y de esta forma contribuir al silenciamiento transcripcional (Figura 5B). Estas proteínas llamadas MBPs o MeCPs, (del inglés: Methyl-Binding Proteins o Methyl-CpG-binding Proteins) utilizan moléculas co-represoras para silenciar la transcripción y modificar el ambiente cromatínico. Una proteína miembro de esta familia es conocida como Kaiso [Yoon *et al.*, 2003]. Se ha demostrado que la represión de genes mediada por Kaiso, ocurre por asociación con complejos co-represores que contienen, entre otro tipo de proteínas, a proteínas desacetilasas de histonas (HDAC) y a la proteína N-CoR responsables de llevar a cabo el silenciamiento epigenético [Yoon *et al.*, 2003; Klose y Bird, 2006]. Así mismo, por resultados previos generados en nuestro laboratorio, se observó que cuando se metila el sitio de unión del factor CTCF en el promotor de *Rb*, éste se disocia y permite, de manera anómala la unión de Kaiso. Además, se demostró que la actividad del promotor del gen *Rb* se recupera hasta un 60% mediante ensayos de reactivación, con el uso de inhibidores de la metilación del ADN (5-aza-2'-deoxicitidina (5-azadC)) en conjunto con el inhibidor de desacetilasas de histonas (Tricostatina A (TSA)) (Figura 15) [De La Rosa-Velázquez *et al.*, 2007].

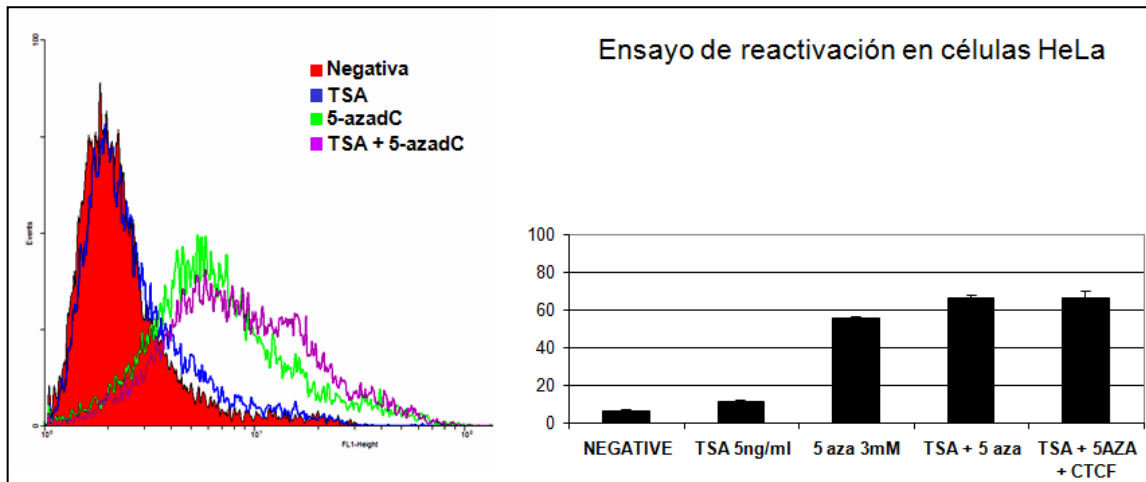


Figura 15. Silenciamiento y reactivación del promotor del gen *Rb*. En el histograma se observa la población de células con la actividad del promotor del gen *Rb* Extinta (rojo) y sobre este gráfico se muestra la recuperación de la actividad en las poblaciones celulares tratadas con TSA (azul), 5-azadC (verde) y TSA + 5-azadC (morado). En el gráfico de barras se muestra el porcentaje de células reactivadas con cada tratamiento.

En resumen, a partir de estos resultados y del estudio de otros promotores de genes relacionados con el control del ciclo celular [Varambally *et al.*, 2002; Lund y van Lohuizen, 2004; Chen *et al.*, 2005], consideramos que existen cambios epigenéticos adicionales involucrados en el silenciamiento de genes importantes para el control del ciclo celular que al des-regularse pueden contribuir al inicio y/o desarrollo de un proceso tumoral.

2.2.1.3. Participación de proteínas del grupo Polycomb

A la fecha la única información que existe sobre la participación de las proteínas PcG en la regulación de *Rb* es curiosamente un estudio con *Arabidopsis thaliana* publicado en el 2008 [Johnston *et al.*, 2008]. En esta investigación se caracterizó la expresión de *Rb* en diferentes tejidos vegetales y se puso en evidencia que *RBR* (el homólogo de *Rb* humano), se expresa de manera alelo-específica y que el alelo que no expresa *RBR* se ve enriquecido significativamente en la marca represora de histonas asociada a PcG, H3K27me3. Además se demostró que esta regulación no es solamente unidireccional, sino que existe una retroalimentación, es decir *RBR* también regula al complejo PRC2 [Johnston *et al.*, 2008].

Este es un ejemplo que refuerza la idea de que, en mamíferos, PcG puede estar formando parte de una red de regulación epigenética de genes, en particular, supresores de tumores. Pero además, apoya el hecho de que un regulador clásico del ciclo celular, como *Rb*, también puede tener un papel en la regulación epigenética. En consecuencia y debido a que aún existe poca información sobre la participación de PcG en la regulación epigenética del promotor del gen *Rb*, nuestro grupo está interesado en entender los mecanismos asociados con PcG que están involucrados en el silenciamiento epigenético de genes supresores de tumores.

Este planteamiento forma parte de la justificación de este proyecto de investigación, además de, como se mencionó antes, la conocida relación entre las proteínas del grupo PcG y los factores de la familia E2F, nuestro interés creció a partir del análisis preliminar que realizamos con la secuencia del promotor *Rb*.

2.2.1.4. Participación de factores de la familia E2F

A la fecha, no hay reportes que sustenten o comprueben una regulación epigenética por parte de los factores E2F, en particular E2F6 sobre el promotor del gen *Rb*. Es en parte, por esta razón y por las evidencias independientes que se tienen de la familia de represores PcG y de los factores de transcripción E2F y por la conocida relación entre ambas familias, que postulamos el posible vínculo entre PcG, E2F6 y *Rb*. Además, datos experimentales generados en nuestro laboratorio sugieren que E2F6 se une al promotor del gen *Rb* y reprime su actividad (Figuras 16 y 17 de resultados) [Dávalos-Salas *et.al.*, datos no publicados]. Por tal razón, hemos pensado que E2F6 puede ser un fuerte candidato reclutador de PcG hacia sus blancos de acción, en particular, a genes supresores de tumores y contribuir de esta manera a la desregulación génica fundamental en procesos carcinogénicos.

Con base a todos los antecedentes descritos previamente, la idea primaria de esta investigación derivada, en parte, por los resultados de De la Rosa *et al.*, 2007, consistió en investigar la participación del grupo PcG en la regulación de *Rb*, sin embargo, como se muestra en los resultados de la primera parte de esta tesis, no se encontraron datos claros y contundentes de esta posible relación. No obstante, no se ha descartado por completo esta hipótesis y la posibilidad de replantear la manera de abordar la pregunta de cómo podría participar Polycomb en la regulación epigenética de *Rb*. Por lo que, en la segunda parte, se muestran los resultados generados por la re-estructuración y nueva dirección que le dimos al proyecto, con la finalidad de seguir caracterizando la regulación epigenética del promotor del gen *Rb*.

3. PARTE 1: Estudio de la participación de E2F6, proteínas de la familia polycomb y la metilación del ADN en la represión epigenética del gen *Retinoblastoma*

3.1. Planteamiento del problema

Está demostrado que los procesos epigenéticos pueden intervenir en la génesis y desarrollo del cáncer [Baylin y Ohm, 2006]. Así mismo, se han propuesto diferentes modelos donde las proteínas Kaiso, E2F6, EZH2 y BMI1, tienen una participación en la represión transcripcional. Por otra parte, se ha demostrado una importante relación de EZH2, BMI1 y otros miembros de Polycomb con el desarrollo de cánceres de mama y de próstata. Más aún, también E2F6 se ha visto relacionada tanto con EZH2, EPC1 como con BMI1 [Dimri *et al.*, 2002; Attwooll *et al.*, 2005]. Sin embargo, hasta ahora no se ha demostrado su participación, ni el mecanismo, de ninguna de estas proteínas en el silenciamiento epigenético del gen supresor de tumores *Rb*.

3.2. Justificación

Dada la relevancia del gen supresor de tumores *Rb* en el control del ciclo celular y en procesos carcinogénicos y la creciente relación de la participación de componentes epigenéticos en su regulación, resulta importante entender el posible papel de la proteína E2F6, de miembros de PcG y la metilación del ADN en procesos de silenciamiento epigenético.

3.3. Hipótesis

La des-regulación del promotor del gen *Rb* humano, puede darse en condiciones patológicas a través de la asociación de E2F6 y por la atracción de miembros de la familia de represores Polycomb, además por la incorporación de metilación del ADN.

3.4. Objetivo general

Caracterizar los mecanismos involucrados en la regulación epigenética del gen *Retinoblastoma* dirigidos por miembros de la familia Polycomb y el factor transcripcional E2F6, así como por los factores asociados a la metilación del ADN en cáncer.

3.4.1. Objetivos particulares

- I. Estudiar la contribución funcional de PcG en el silenciamiento epigenético de *Rb* tanto *in vivo* como *in vitro*.
- II. Demostrar la posible función de PcG y E2F6 en el silenciamiento epigenético de *Rb*.

3.5. Resultados y Discusión

3.5.1. Las proteínas E2F6 y EZH2 disminuyen la actividad del promotor del gen *Rb* en transfecciones transitorias

Dado que en el promotor del gen *Rb* existe un sitio de unión al ADN de factores E2F y por antecedentes de la literatura y análisis bioinformático realizado en nuestro laboratorio, establecimos existe la probabilidad de que el factor represor E2F6 se una a ese sitio en el promotor (Figura 16A). Por lo tanto, la primera pregunta que nos planteamos fue si la sobre-expresión de E2F6 tenía algún efecto sobre la regulación del promotor del gen *Rb* y los niveles del gen reportero de la *Luciferasa*. Para abordar esta pregunta se realizaron transfecciones transitorias en células HeLa de los plásmidos que contienen el ADNc de E2F6, el gen reportero de la *Renilla* como control interno y de *Luciferasa* bajo el control del promotor del gen *Rb* (Figura 16A, B y C).

Así mismo, también por antecedentes de otras investigaciones sabemos que el grupo PcG puede interaccionar con E2F6 [Trimarchi *et al.*, 2001; Ogawa *et al.*, 2002; Attwooll *et al.*, 2005; Storre *et al.*, 2005]. Entonces nos preguntamos si E2F6 tenía la capacidad de reclutar en el promotor del gen *Rb* al grupo PcG, en particular a EZH2, y ver si el efecto de E2F6 se modificaba o potenciaba. En la figura 17 se muestra el efecto

de la co-transfección de E2F6, EZH2 y la combinación de ambos dirigiendo la expresión del gen de la *Luciferasa*. Como se puede ver, tanto E2F6 como EZH2 tienen un efecto represor dosis dependiente (Figuras 16B y C). Este efecto no se potencia cuando se transfectan simultáneamente E2F6 y EZH2 (Figura 17D). En resumen, la actividad del promotor del gen *Rb* es afectada por las proteínas E2F6 y EZH2.

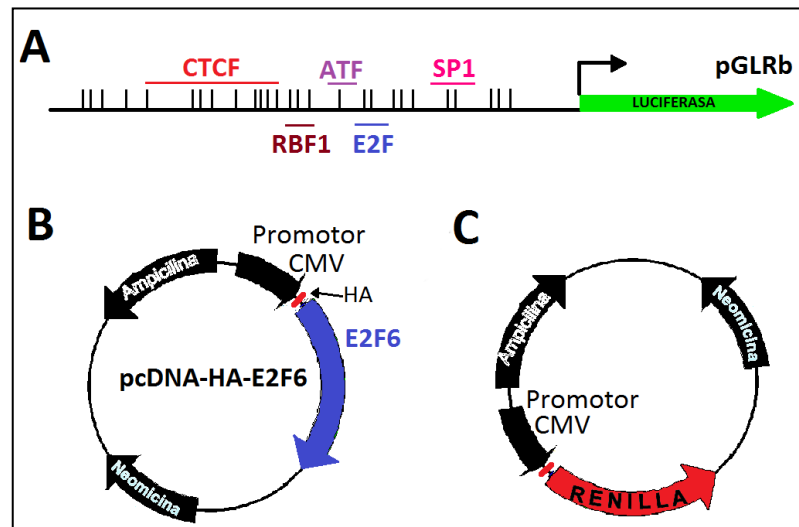


Figura 16. Esquema de los plásmidos con los genes clonados de la *Luciferasa*, *Renilla* y E2F6. **A-** Región promotora del gen *Rb* humano clonado río arriba del gen reportero de la *Luciferasa*. La región clonada abarca aproximadamente 350 pares de bases. Se muestran los dinucleótidos CpG (líneas verticales) y los sitios de unión de los principales factores de transcripción incluyendo la localización de CTCF y E2F. **B-** Estructura del plásmido pcDNA-HA-E2F6 y **C-** Estructura del plásmido con el reportero *Renilla*

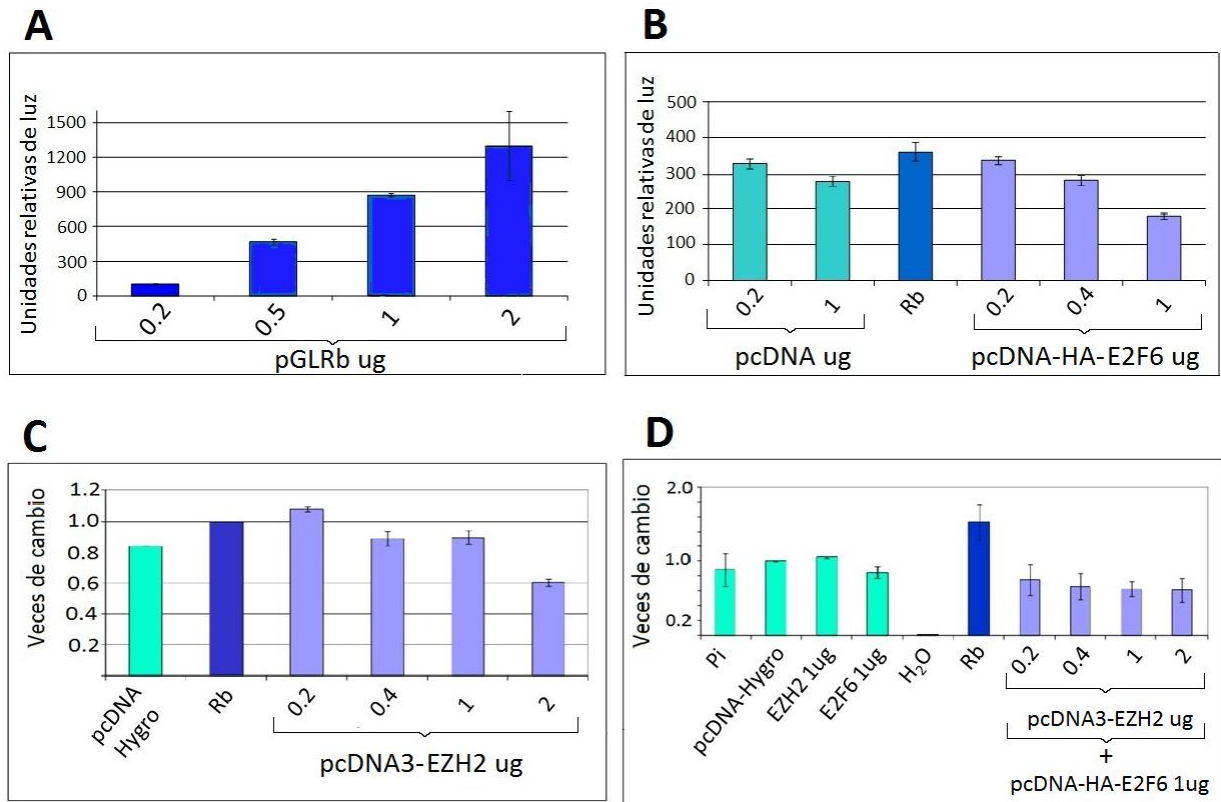


Figura 17. Efecto de la sobre-expresión de E2F6 y EZH-2 sobre la actividad del promotor *Rb*. **A-** Actividad basal del promotor *Rb*. **B-** La sobre-expresión de las proteínas E2F6 y **C-** EZH-2, causan la represión de la actividad del promotor del gen *Rb* cuando se transfectan por separado transitoriamente en células HeLa. **D-** En la co-transfección de los plásmidos pcDNA3-EZH-2 + pcDNA-HA-E2F6 no se potencia el efecto. Los plásmidos pcDNA, pcDNA-Hygro y Pi se utilizaron como controles irrelevantes.

3.5.2. La proteína E2F6 tiene efectos sobre la proliferación celular

Posteriormente quisimos comprobar que el efecto observado en las células a las que se les transfectó el ADNc de E2F6 en cantidades crecientes, era proporcional en la cantidad de proteína E2F6. Para esto, realizamos un ensayo de Western blot con concentraciones crecientes de extractos proteicos obtenidos de células HeLa transfectadas establemente con el ADNc de E2F6 (HeLa-E2F6) (Figura 18A). Por otra

parte, dado que se observó un efecto sobre la actividad del promotor del gen *Rb* en las transfecciones transitorias, quisimos corroborar que efectivamente éste fue debido a que la proteína E2F6 se une al promotor, lo cual realizamos mediante la técnica de cambio de movilidad electroforética o EMSA (Figura 18B).

Aunque fue posible detectar a la proteína E2F6, al comparar los carriles 1 y 4 en la figura 18A, se observa que no hay diferencias en la cantidad de proteína E2F6 entre los extractos provenientes de las células HeLa silvestre y de las células HeLa-E2F6. En contraste, cuando se transfectan cantidades menores del plásmido, carriles 2 y 3, los niveles de proteína E2F6 disminuyen si se compara con la cantidad de proteína en el carril 1. El hecho de haber encontrado en las células HeLa silvestre que la cantidad basal de E2F6 sea alta, hecho que no conocíamos *a priori*, nos sugiere que difícilmente se lograrían sobre pasar estos niveles y tener un efecto celular evidente. De hecho, por la literatura sabemos, que las cantidades de todos los factores E2F a lo largo de todo el ciclo celular son constantes y que su participación y efecto depende del momento celular específico [Xu *et al.*, 2007]. Por el contrario, la disminución ocasionada por la transfección, nos hace pensar que E2F6 puede autorregular su expresión y que el umbral para generar esta respuesta se alcanza con niveles mínimos de plásmido, por lo que una vez alcanzado éste, el sistema se satura de tal manera que se pierde la capacidad de respuesta. Lo que se detecta experimentalmente como cantidades similares de proteína (carriles 1 y 4). Este resultado nos dio un indicio de que

probablemente con este acercamiento experimental no podríamos dilucidar la participación de la proteína E2F6. Sin embargo, en este punto se decidió continuar con el análisis. Entonces, como se había predicho, por nuestros análisis bioinformáticos y por la comparación con otras secuencias ya reportadas por otros, la proteína E2F6 sí se une a su sitio en la secuencia del promotor del gen *Rb*. Sin embargo, no podemos asegurar que el complejo formado esté constituido específicamente por E2F6, porque como se ve en la figura 18 en el último carril (super-shift) cuando se incuban los extractos proteicos con anticuerpo anti-E2F6, el complejo formado no desaparece. Probablemente porque el epítopo de la proteína que reconoce el anticuerpo esté poco accesible o escondido por otra proteína del complejo formado. Cabe resaltar que este ensayo se repitió varias veces modificando las condiciones de unión, pero no se obtuvo un mejor resultado.

Con el objetivo de entender la posible contribución del factor E2F6 y dado que en el sistema estudiado con células HeLa, no se logró un avance significativo, se estableció otra línea celular de estudio por dos razones, la primera trabajar sobre un contexto celular diferente y menos alterado respecto al contenido cromosómico. La segunda razón fue por que metodológicamente estas células que crecen en suspensión, lo cuál facilitaba la manipulación dada la naturaleza de los experimentos que se tenían planeados. Entonces, a la línea celular eritroleucémica K562 se les transfirió establemente el ADNc de E2F6 para generar la línea K562-E2F6.

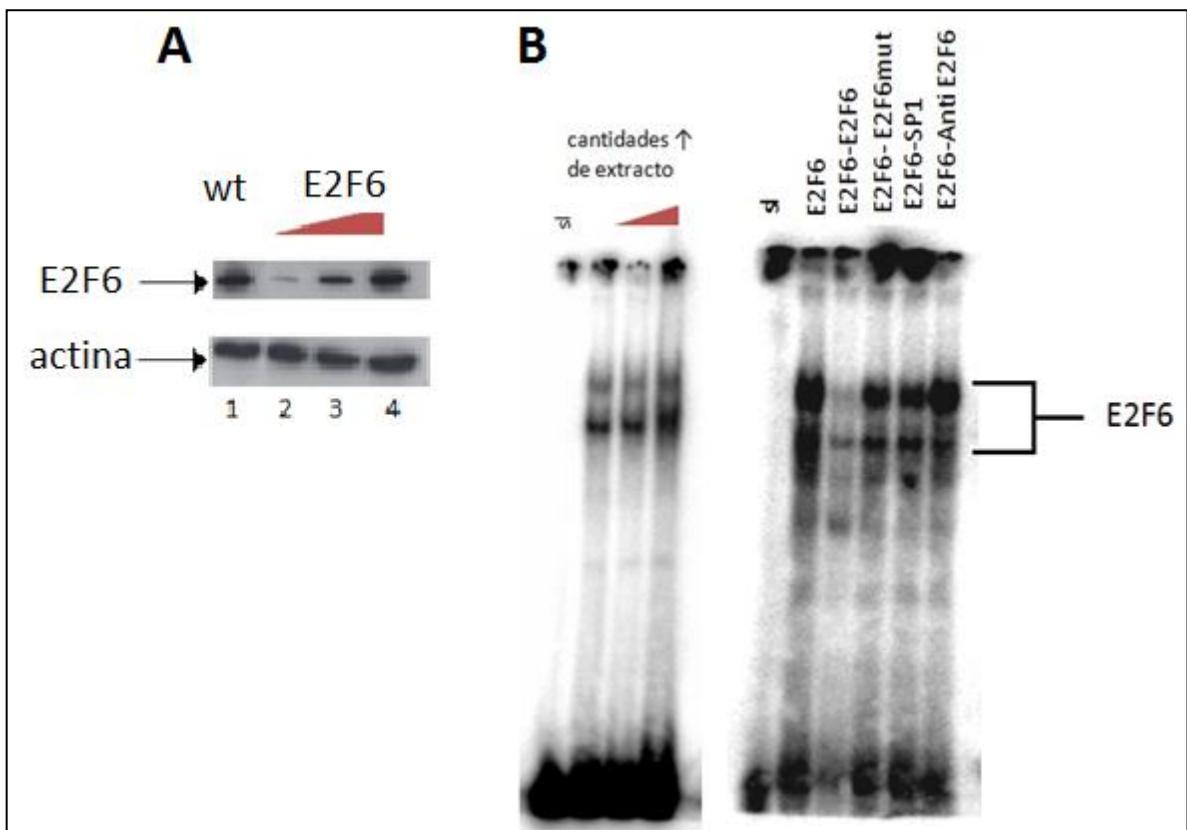


Figura 18. Análisis de la sobre-expresión E2F6 en células HeLa y de su capacidad de unirse al promotor del gen *Rb*. **A-** Western blot con extractos proteicos de: células HeLa silvestre (carril 1) y de células HeLa transfectadas establemente con el ADNc de E2F6 en cantidades crecientes (carriles 2-4). **B-** Ensayo de cambio de movilidad electroforética o EMSA donde se aprecian los complejos ADN-proteína, formados con una sonda marcada radiactivamente con ^{32}P con la secuencia específica del sitio de unión de E2F6 en promotor *Rb* humano (ver figura 16A).

Tras la continua observación de las células K562-E2F6 en cultivo nos dimos cuenta que proliferaban con mayor rapidez comparadas con las K562 silvestre. Con base en estas observaciones nos preguntamos si el factor E2F6 estaba alterando la fisiología celular, específicamente a nivel de progresión del ciclo celular. Para probar esta predicción, se realizó un análisis de la cinética de crecimiento celular, lo cual se hizo por

quintuplicado. Los cultivos se mantuvieron en cajas de Petri con un volumen constante de 30 ml durante 8 días. En la gráfica de la figura 19A se observa que las células K562-E2F6 alcanzan con mayor rapidez la fase logarítmica de crecimiento comparadas con las K562 silvestres. Con los datos de la fase logarítmica se realizó el cálculo del tiempo de duplicación y se graficó el resultado (Figura 19B) observándose claramente que las células K562-E2F6 se duplican en un tiempo promedio menor (23.57 horas) en comparación con las células K562 silvestres cuyo tiempo de duplicación fue 29.43 horas. El hecho de que E2F6 disminuyera el tiempo de duplicación nos hizo pensar que otros genes blanco de E2F6 podrían estar involucrados en la patogénesis del cáncer, dado que su inhibición propició la proliferación celular. Estas observaciones consistentes, nos llevaron a enfocarnos en el efecto evidente, aunque indirecto, que la sobre-expresión de la proteína E2F6 tuvo sobre el ciclo celular. Por lo que procedimos a investigar si la estructura de la cromatina del promotor de gen *Rb* en las células K562-E2F6 se modificaba comparándola con la de las células K562.

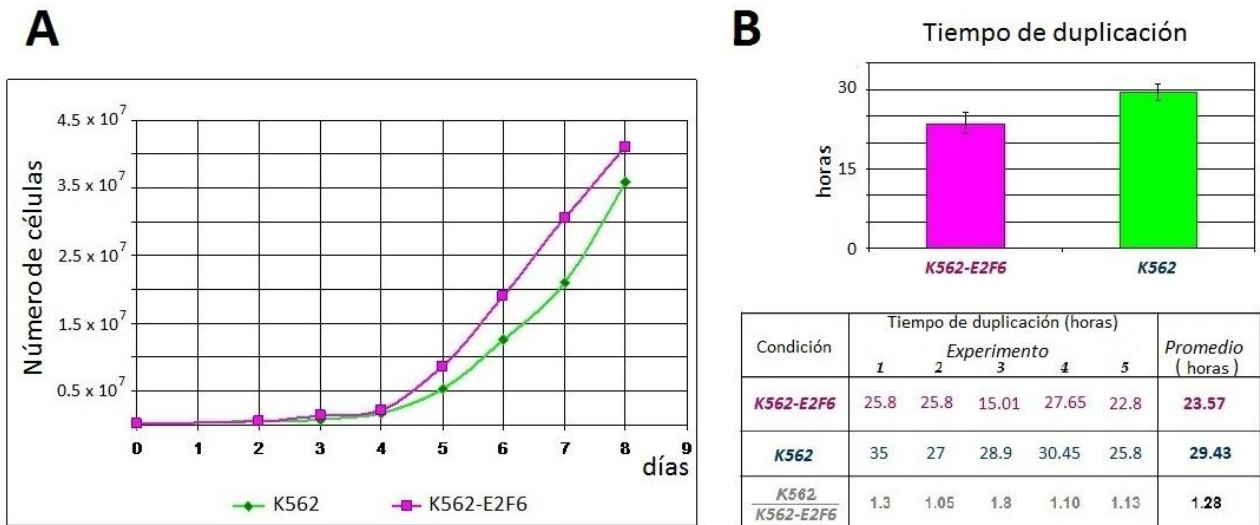


Figura 19. Tiempo de duplicación celular. **A-** Gráfica que muestra el crecimiento celular monitoreado durante 8 días. **B-** Gráfica del tiempo de duplicación celular calculado en el periodo de la fase logarítmica de crecimiento (arriba) y recopilación de datos de 5 experimentos independientes (datos numéricos resumidos en la tabla inferior).

3.5.3. Presencia de EZH2 y su regulación con el factor E2F6 en el promotor del gen *Rb in vivo*

Con los resultados anteriores en mente, surgió la inquietud de saber si el efecto indirecto que se observó en el ciclo celular, estaba de alguna manera relacionado con la regulación de la expresión del gen *Rb* y su producto peptídico, ya que este es uno de los principales reguladores del ciclo celular. Además, estos resultados sugerían fuertemente que el freno o restricción proliferativa que normalmente tienen las células, se había perdido en la línea celular K562-E2F6. Para abordar tal cuestionamiento, se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) explorando la posible

participación tanto de EZH2 (por ser una proteína perteneciente a la familia PcG) como de E2F6 por ser el factor de transcripción que se relaciona y atrae a la familia de represores PcG a sus sitios blanco. Después de hacer la inmunoprecipitación se encontró que la presencia de E2F6 y la ausencia de EZH2 no fueron diferentes en las dos condiciones estudiadas (Figura 20A y B). El experimento se repitió con otra línea celular K562-E2F6 independiente y se obtuvo el mismo resultado. Por lo que pensamos que el efecto tanto de E2F6 como de EZH2 sobre la proliferación celular muy probablemente era consecuencia de que se están afectando otros genes importantes del ciclo y no *Rb*. Es importante mencionar que nos surgió la inquietud por conocer el estado de las ciclinas, principalmente las involucradas en la vía p16-Rb. Sin embargo, no profundizamos en ello porque esto implicaba alejarse del objetivo planteado en el proyecto.

Con el objetivo de abordar desde otra perspectiva la posible participación de E2F6 y EZH2, se exploró su presencia en 3 contextos celulares diferentes. Se utilizaron células K562 con la integración del transgén con mutación del sitio de unión de CTCF en el promotor del gen *Rb*, células HeLa con la integración del transgén con el promotor del gen *Rb* intacto y activo y células HeLa con la integración del transgén con el promotor del gen *Rb* intacto e inactivo. En estas condiciones no observamos cambios en la presencia de ninguna de las dos proteínas (datos no mostrados).

Cabe resaltar que las inmunoprecipitaciones no se realizaron partiendo de células sincronizadas, lo cual pudo haber influido en el estudio del regulador del ciclo celular, *Rb*. Razón por la cual es necesario asegurarse de partir de cultivos sincrónicos y así analizar la ventana de tiempo correcta. Como se aprecia en la figura 13 el factor E2F6 parece participar en un momento determinado del ciclo celular. Como se planteó desde los antecedentes, el factor E2F6 puede interactuar con EZH2, entonces el trabajar con cultivos asincrónicos pudo ser la razón por la cual no se encontró a ninguna de las dos proteínas en el tiempo estudiado. Finalmente, este resultado no descarta concluyentemente la participación de PcG ni de E2F6 en el silenciamiento epigenético del promotor del gen *Rb*, simplemente se tienen que replantear y abordar de manera distinta su posible contribución. Además, resulta necesario tener controles adicionales que guíen la investigación por el camino correcto.

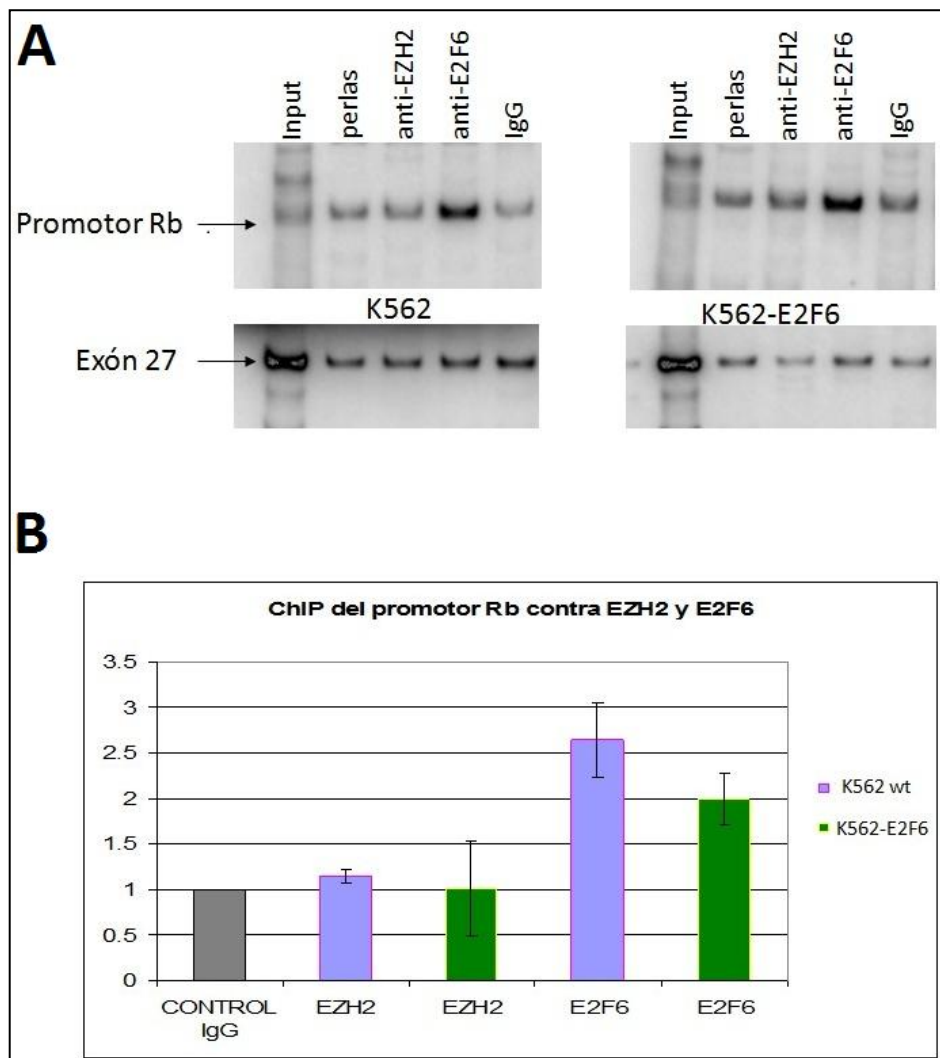


Figura 20. Análisis de EZH2 y E2F6 en la región del promotor del gen *Rb*. **A-** ChIP en las células K562 (izquierda) y K562-E2F6 (derecha). **B-** La presencia de ambas proteínas es similar cuando se cuantifica la intensidad de la banda en los dos contextos celulares. La intensidad de las bandas se determinó con el programa ImageQuant. Este no es un ensayo estrictamente cuantitativo dado que no se utilizó un control interno en la reacción de PCR.

3.6. Conclusiones

Con los resultados que se obtuvieron en esta parte del proyecto se concluye lo siguiente:

- Tanto EZH2 como E2F6 tienen un efecto represor sobre la actividad del promotor del gen *Rb* humano en transfecciones transitorias.
- La sobre-expresión de E2F6 modifica de alguna manera la cinética del ciclo celular. Aunque, en este punto no se sabe en qué nivel está actuando y si su efecto es directo o indirecto a través de la des-regulación de genes que, a su vez, regulan la proliferación celular.
- Entre las dos condiciones celulares estudiadas, K562 y K562-E2F6, no se encontraron cambios de la presencia de las proteínas E2F6 y EZH2 en el promotor del gen *Rb*.
- Con estos resultados no se puede atribuir algún papel regulatorio a nivel epigenético por parte de estas proteínas, pero aún no se puede descartar por completo su participación.

3.7. Perspectivas

Es necesario replantear nuevas preguntas y explorar distintas estrategias experimentales para poder dilucidar la participación de las familias de proteínas E2F, en particular E2F6, y la familia de represores epigenéticos PcG en la regulación del

promotor del gen *Rb* humano. Más aún, resulta importante incluir en este replanteamiento, participantes alternativos relacionados con estas familias y que por lo tanto podrían influir en la regulación epigenética del gen *Rb*. Por ejemplo podrían considerarse otros miembros de la familia E2F o incluso la participación de los ARNs no-codificantes, a los cuales ahora se les ha encontrado múltiples funciones regulatorias.

Por otra parte, también creo necesario rediseñar el modelo de estudio. Por antecedentes de la literatura se sabe que para las islas CpG, su regulación puede provenir desde regiones lejanas hacia la zona más densa en dinucleótidos CpG de la isla [Irizarry *et al.*, 2009]. Estas regiones se conocen como “CpG-island shores” o bordes de la isla, que generalmente se encuentran incluso a varias kilobases hacia los extremos 5' y 3' en relación con la zona más densa de CpGs de la isla. Entonces, se podrían monitorear cambios en estas regiones aledañas y medir los efectos que tengan sobre el núcleo del promotor y por consecuencia en el gen *Rb*, tanto *in vivo* como en cultivos celulares.

Dado que los resultados obtenidos fueron poco concluyentes, de manera inmediata propusimos cambiar de rumbo y ampliar la caracterización de participación de la metilación sobre la actividad del promotor, así como la contribución de CTCF. Para lo cual se replanteó el proyecto como lo explico en la siguiente sección.

4. Parte 2: Estudio del silenciamiento del promotor del gen *Retinoblastoma* humano vía la metilación del ADN en líneas celulares tumorales

4.1. Planteamiento del problema

La co-relación de metilación del ADN con el silenciamiento génico, es el proceso epigenético más ampliamente estudiado. Sin embargo, los mecanismos precisos de cómo se establece, de manera anormal, esta metilación del ADN en secuencias regulatorias importantes que deberían permanecer libres de metilación, aún se desconoce.

Tampoco se conoce el perfil de metilación en las líneas celulares que carecen de la capacidad de unir CTCF (K562 pRBMutE). Además, datos de la literatura sugieren que en gliomas el promotor del gen *Rb* se encuentra inactivado por metilación en altos porcentajes. Sin embargo en ninguno de estos contextos se ha hecho un estudio detallado sobre la participación de CTCF en dicha inactivación, no se sabe si las proteínas CTCF, Kaiso, DNMT1 y proteínas de unión a ADN metilado participan en el silenciamiento, ni se conoce el perfil de modificaciones post-transcripcionales de histonas. Por lo tanto, creímos imprescindible abordar desde esta perspectiva el estudio de los mecanismos de silenciamiento del promotor del gen *Rb* en distintos contextos celulares.

4.2. Justificación

Dada la relevancia del gen supresor de tumores *Rb* en el control del ciclo celular y en procesos carcinogénicos y la creciente relación de la participación de componentes epigenéticos en su regulación, resulta importante entender el papel de la metilación del ADN en el silenciamiento epigenético del mismo.

4.3. Hipótesis

Los procesos epigenéticos como metilación del ADN, desacetilación y metilación de histonas, así como la actividad de las proteínas CTCF, Kaiso, DNMT1 y proteínas de unión al ADN metilado, participan en el silenciamiento epigenético del promotor del gen *Rb* humano de manera anormal en células tumorales y en células donde CTCF sea incapaz de unirse a su sitio en el promotor.

4.4. Objetivo general

Estudiar el estado de metilación en las diferentes líneas celulares generadas en el laboratorio en las cuales CTCF no se une a su sitio en el promotor del gen *Rb*, así como en algunas líneas celulares de gliomas en las cuales la literatura sugiere una importante contribución epigenética en el silenciamiento génico.

4.4.1. Objetivos particulares

- I. Investigar la participación de la metilación del ADN y la acetilación y la metilación de histonas en el silenciamiento epigenético del promotor del gen *Rb* en diferentes contextos celulares (células de cáncer cérvicouterino HeLa y eritroleucémicas K562 modificadas y generadas en el laboratorio) que se explican a continuación y en algunas líneas celulares de gliomas para comparar, dados los antecedentes en la literatura, el estado del promotor con un contexto anormal que ocurre de manera natural.
 - Células HeLa con el promotor del gen Retinoblastoma integrado de manera estable cultivadas durante 100 días continuos, HeLa pRb(-)100, y durante 170 días, HeLa pRb(-)170. Las dos líneas celulares con la actividad del promotor extinta
 - Células K562 con el promotor del gen Retinoblastoma con una mutación puntual que abate la unión del factor CTCF, integrado de manera estable, K562 pERbMutE
 - Gliomas T98G, U87MG, U373MG, SH-SY5Y
- II. Investigar la posible participación de CTCF, Kaiso, MeCP2 y MBD, así como modificaciones post-traduccionales de histonas que

correlacionan con cromatina abierta (acH3, acH4) o cerrada (H3K27me3), en el silenciamiento del promotor del gen *Rb* ectópico o endógeno en los diferentes contextos celulares en función del estado de la metilación del ADN.

- III. Correlacionar los cambios a nivel epigenético con los niveles de expresión del gen *Rb* en los contextos celulares estudiados.

4.5. Resultados y Discusión

4.5.1. El análisis del estado de la metilación del ADN del promotor del gen *Rb*, revela que se incrementa con las divisiones celulares

Como parte del estudio del estado de metilación las células HeLa transfectadas establemente con el promotor del gen *Rb* dirigiendo la expresión de la proteína GFP, en la figura 21 se muestra un panorama general de la región clonada y de los dinucleótidos CpG que se analizaron posterior a la modificación con bisulfito de sodio.

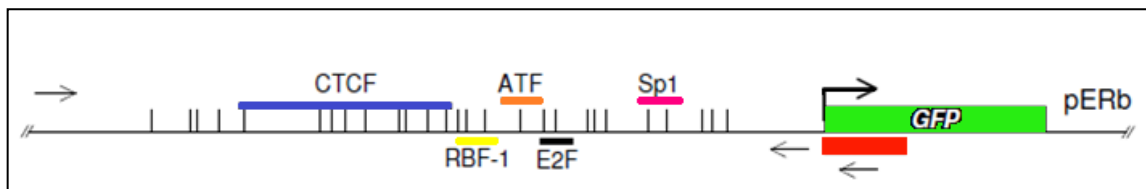


Figura 21. Esquema de la región promotora del gen *Rb* humano clonado río arriba del gen de la GFP. En la figura se muestra la región clonada que abarca aproximadamente 350 pares de bases. Se muestran los dinucleótidos CpG (líneas verticales) y los sitios de unión de los principales factores de transcripción incluyendo la localización del factor CTCF. Las flechas horizontales indican la posición de los oligonucleótidos diseñados para amplificar por PCR la región del promotor.

En la figura 22 se muestra el perfil de metilación, a partir de un ensayo de transformación por bisulfito de sodio, de una población celular que fue mantenida en cultivo continuo durante 130 y 170 días, cuya actividad del promotor del gen *Rb* está

silenciada. La actividad fue monitoreada por la presencia de la proteína verde fluorescente (GFP) mediante citometría de flujo (FACS). Estos resultados muestran un incremento en los niveles de metilación del ADN en los 27 dinucleótidos CpG potencialmente metilables en el promotor del gen *Rb*. Lo que se observa como un incremento que va del 14.1% en las clonas de 130 días hasta el 22.9% en las clonas de 170 días. Estos resultados nos sugieren, por una parte, que la metilación se incorpora de forma gradual, posiblemente en cada división celular, y además, que ella misma es parte de los mecanismos de silenciamiento del promotor del gen *Rb* en los contextos celulares anormales.

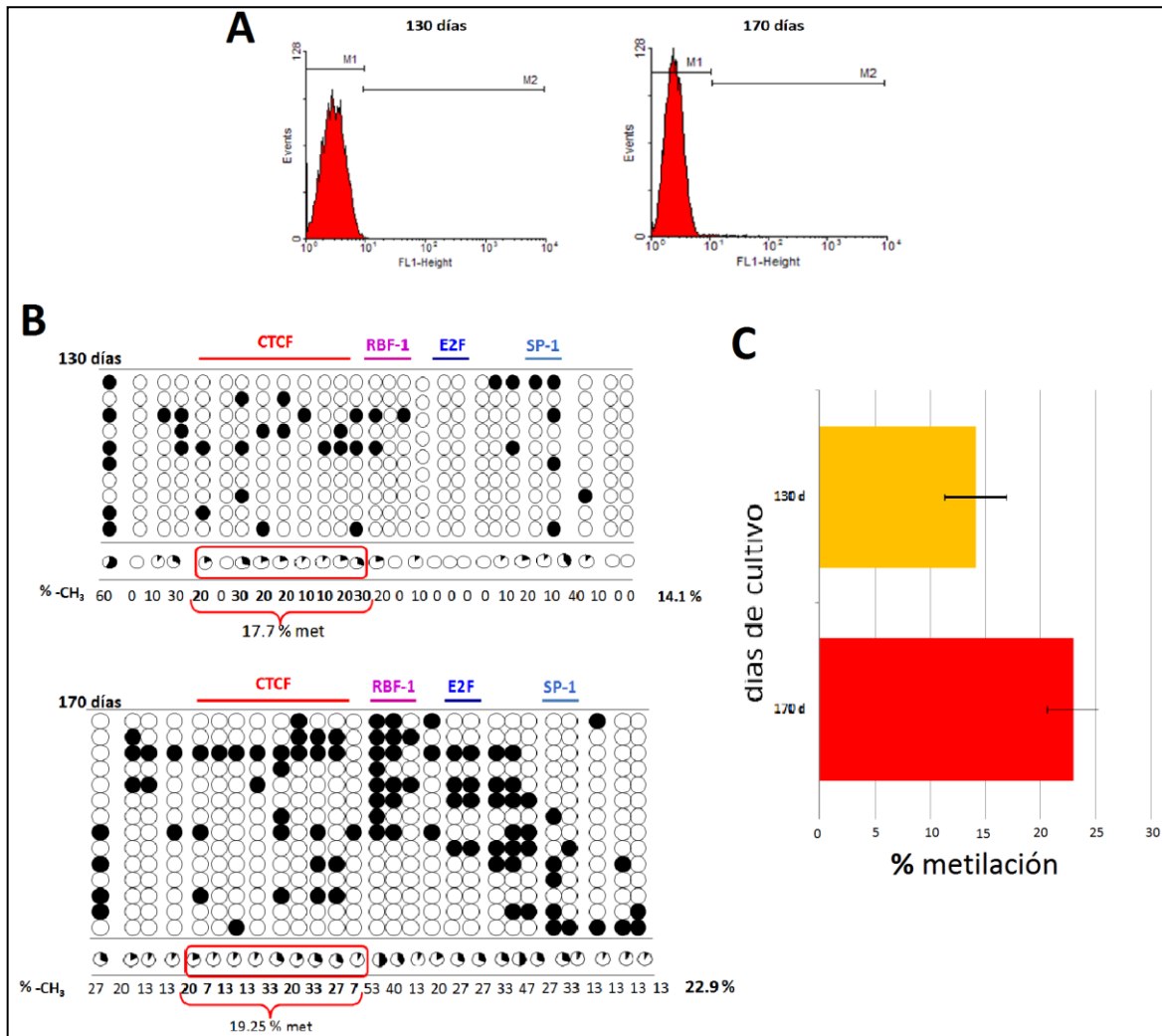


Figura 22. Ganancia progresiva de la metilación del ADN en el promotor de *Rb*. En la figura se muestra el estado de la metilación del ADN de una línea celular HeLa la cual tiene integrado una sola copia del transgen mostrado en la Figura 20. **A-** Perfiles de citometría de flujo de las células cultivadas a los tiempos mencionados. **B-** Porcentajes de metilación individual y global a los 130 y 170 días de cultivo continuo. **C-** Resumen de los datos graficados en porcentajes de metilación.

4.5.2. La extinción de la actividad de transgén con el promotor del gen *Rb* se acentúa cuando el sitio de unión de CTCF está mutado

Para confirmar la contribución de CTCF en la protección contra el silenciamiento epigenético del gen supresor de tumores *Rb*, se generaron clones con una mutación (*MutE*) que evitan la unión de CTCF, previamente caracterizada por De la Rosa-Velazquez (Figura 23) [De la Rosa-Velazquez *et al.*, 2007].

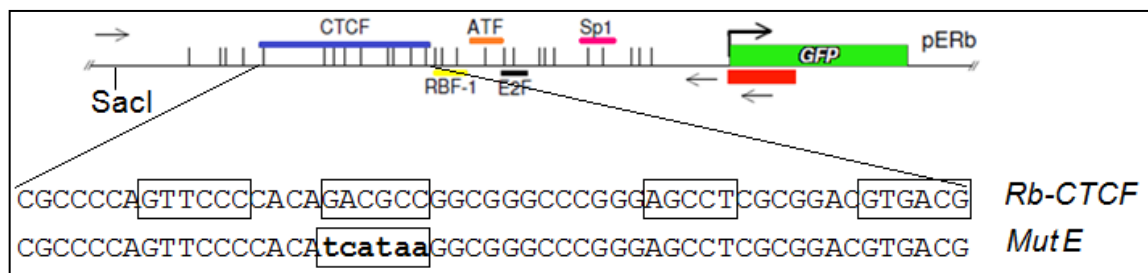


Figura 23. Ubicación de la mutación del sitio de unión de CTCF en la secuencia del promotor del gen *Rb*. La secuencia de unión al factor CTCF es mostrada señalando en un recuadro las cajas de unión (*Rb-CTCF*). En un recuadro y en negritas se muestra la mutación que abate por completo la unión de CTCF al promotor (*MutE*) caracterizada por De la Rosa-Velazquez *et al.*, 2007.

En este contexto se generaron 19 clones independientes con el transgén que tiene el promotor del gen *Rb* con el sitio de unión de CTCF mutado fusionado al gen reportero *GFP* integrado de manera estable (*pERbmutE*) y 18 clones con el promotor intacto (*pERb*). Todas las clones fueron establecidas en la línea celular eritroleucémica K562 humana. La integridad del transgén en cada una de las clones fue confirmada por

Southern blot (Figura 24A y B). Como se resume en la tabla de la figura 24, al término de los 100 días de cultivo continuo se encontró que casi el doble de las clonas pERbmutE tenían silenciado el gen *GFP*, en contraste a lo ocurrido en las clonas pERb. Además cabe resaltar que en las clonas pERb el perfil de FACS resultó como se esperaba para este promotor considerado como “fuerte”, es decir un perfil claramente activo con un histograma angosto y pronunciado. Así mismo, es importante destacar que las clonas pERbmutE perdieron la expresión del gen *GFP* en un periodo de tiempo mucho más corto comparado con las pocas clonas pERb que también perdieron la expresión.

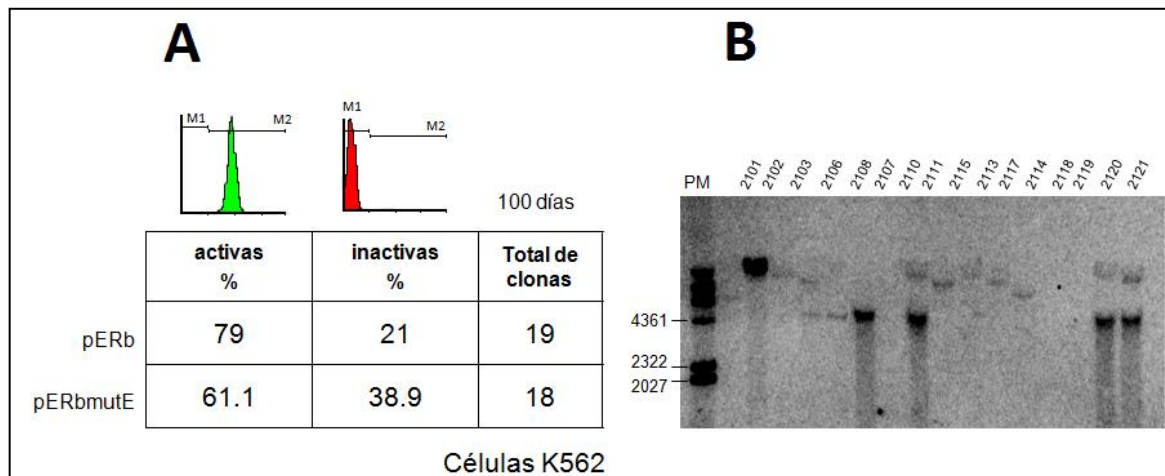


Figura 24. Caracterización funcional e integridad de los transgenes en las clonas K562-pERb y pERbmutE. **A-** Perfiles de FACS representativos y resumen del comportamiento de los dos grupos de clonas pERb y pERbmutE. Después de 100 días de cultivo continuo hay 2 veces más clonas con el transgén extinto cuando el sitio de unión de CTCF está mutado. **B-** Se muestra el análisis de la integridad de los transgenes insertados en el genoma de las células K562 mediante Southern blot.

4.5.3. Las clonas con la mutación del sitio de CTCF en el promotor del gen *Rb* son diferencialmente reactivadas

A partir de resultados previos en el laboratorio, sabemos que CTCF protege, al menos en parte, de la metilación al promotor del gen *Rb* y contribuye a su adecuada actividad [De la Rosa-Velazquez *et al.*, 2007]. Entonces, otra vertiente de la caracterización que a nosotros nos interesó, fue, saber si en un contexto donde CTCF no ejerza su acción sobre el promotor, debido a que no se pueda unir, el silenciamiento epigenético ocurría a tiempos tempranos y si esto correlacionaba con el incremento de la metilación del ADN en el promotor. Además, de conocer lo anterior, la siguiente pregunta que nos planteamos fue: ¿Se pueden revertir las modificaciones epigenéticas, como metilación del ADN y desacetilación de histonas y así de esta forma re-activar al promotor del gen *Rb*?

Para resolver estas preguntas, se realizaron dos series de transfecciones independientes del transgén reportero con el promotor del gen *Rb* mutado puntualmente en la región de unión de CTCF (Figura 23). Primero se realizó la calibración de las concentraciones óptimas de las las drogas tricostatina A (TSA) y 5-aza-2-deoxicitidina (AZA) y el tiempo de tratamiento óptimo con ambos compuestos. Se trataron durante 48 h a 300 000 células K562-pERbmutE en pozos de 3 cm de diámetro con 3, 5 y 15 μ M de AZA y con el volumen de vehículo correspondiente a la mayor concentración. En cada caso se cuantificó la cantidad de la proteína GFP mediante citometría de flujo como

manera indirecta de evaluar la actividad del promotor (Figura 25A) y la viabilidad celular por el método de exclusión con azul tripano (datos no mostrados). Como se observa, en los tres casos se obtuvo una reactivación de aproximadamente 20% y menos del 2% de mortalidad celular, por lo que se decidió incrementar la concentración de AZA a 30 μ M donde se obtuvo mayor reactivación y una mortalidad de alrededor del 10% (datos no mostrados). En el caso del tratamiento con TSA se fijó la concentración en la cual se obtenía la mayor reactivación con la menor toxicidad celular. En la figura 24B se muestra el curso temporal del tratamiento con 15 ng/ml de TSA en las K562-pERbmutE medido por citometría de flujo a las cero, 24, 48 y 72 h post-tratamiento. Como se observa en la gráfica y en la tabla a las 72 h se obtiene el mayor efecto.

Cuando se procedió a realizar el experimento con las concentraciones y tiempos definidos experimentalmente utilizando ambos compuestos simultáneamente, se alcanzaron condiciones tóxicas para las células, por lo que se disminuyó la concentración de TSA de tal manera que al combinarla con AZA no fuera tóxica para el cultivo, pero suficiente para que se observara algún efecto reactivante. La concentración de 12.5 ng/ml se utilizó en todos experimentos posteriores.

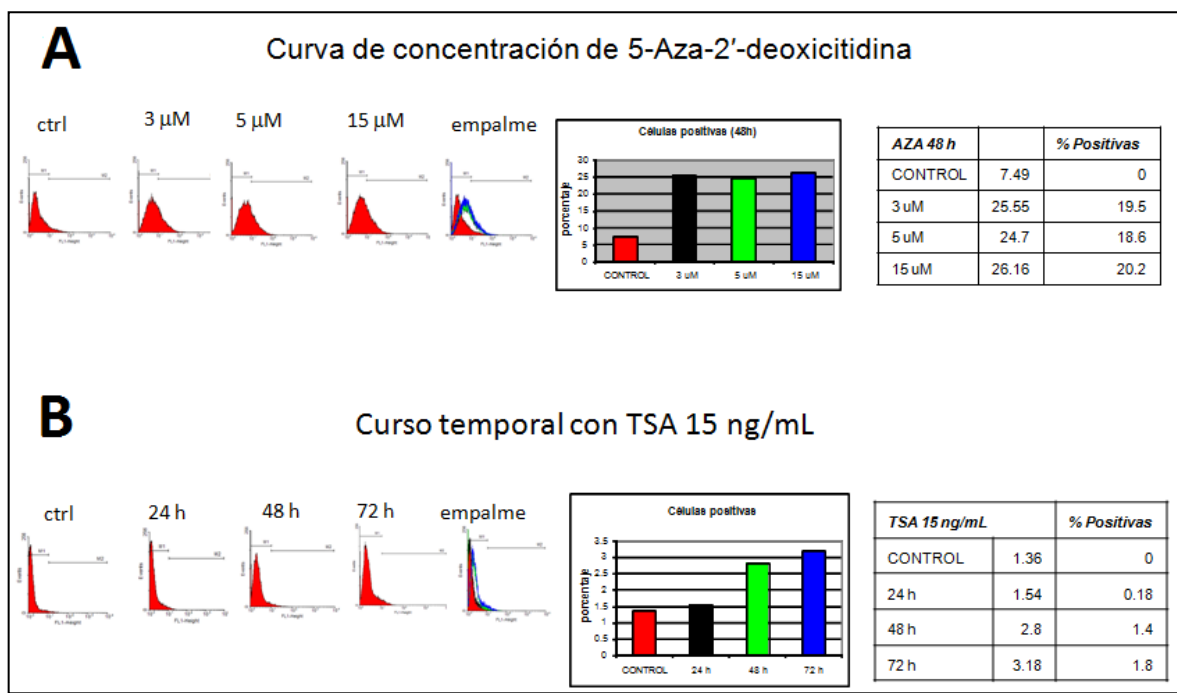


Figura 25. Calibración de tiempo y concentración de los tratamientos con tricostatina A (TSA) y 5-aza-2-deoxicitidina (AZA) en las células K562-pERbmutE. **A-** Curva de concentraciones de AZA (0, 3, 5, 15 μ M) durante 48 h y **B-** Curso temporal del tratamiento con TSA durante 72 h. De izquierda a derecha se muestra el FACS de cada tratamiento y la grafica y tabla con el porcentaje de células positivas y reactivadas. Con ambos compuestos TSA y AZA, se observa un porcentaje de reactivación siendo más pronunciada en el tratamiento con AZA.

Una vez establecidas las condiciones de los tratamientos, se incubó a los cultivos celulares por separado con 12.5 ng/ml de tricostatina A (TSA) y con 30 μ M de 5-aza-2-deoxicitidina (AZA) y con ambos reactivos al mismo tiempo. Se hicieron los tratamientos por triplicado con cuatro clones independientes provenientes de dos diferentes transfecciones. Esto se realizó a dos tiempos, 30 y 100 días de cultivo continuo. Como se observa en la figura 26, el principal efecto reactivante ocurre en los grupos tratados con AZA, en contraste con lo que ocurre en los grupos que se trataron con TSA, en los

cuales se presenta un efecto reactivante mínimo e incluso parece un tanto tóxico en algunas clonas. Comparando los tratamientos de los cultivos de 30 días con los de 100 días, la mayor reactivación se obtiene a tiempos tempranos en ambos conjuntos de experimentos. Con ambos reactivos no se aprecia ningún efecto sinérgico. Estos resultados nos indican que bajo estas condiciones la mayor contribución al silenciamiento de *Rb* es debido principalmente a la metilación del ADN. Sin embargo, estos resultados también indican que a medida que pasa el tiempo, una vez que se ha iniciado y establecido el silenciamiento epigenético, hay factores epigenéticos adicionales que también parecen estar involucrados, dado que en ninguno de los tiempos en los que se aplicó el tratamiento, fue posible reactivar al 100%.

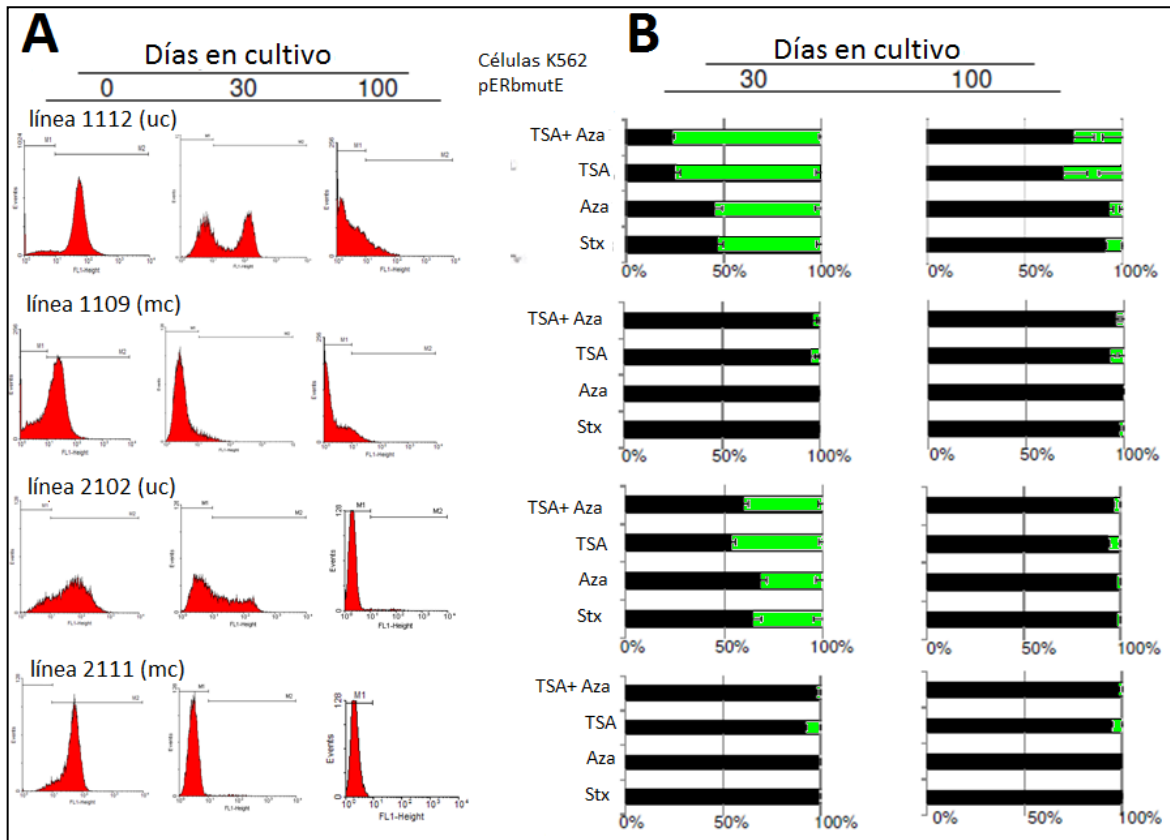


Figura 26. Análisis de las clonas K562-pERbmutE en el tiempo y tratamiento con tricostatina A (TSA) y 5-aza dCiditina (AZA). **A.-** Perfiles de citometría de flujo de 4 clonas de dos experimentos independientes, donde se observa extinción de la actividad del promotor del gen *Rb*, medido como pérdida de fluorescencia. El análisis se hizo a los 0, 30 y 100 días. **B.-** Cuantificación del porcentaje de células reactivadas después del tratamiento con TSA y AZA a los 30 y 100 días de cultivo.

4.5.4. El promotor del gen *Rb* está hipermetilado en las líneas celulares con el sitio CTCF mutado

Una vez definida la participación de la metilación del ADN, fue necesario para nosotros saber puntualmente cuales eran los CpG que estaban metilados y si existía algún sitio preferencial de metilación que pudiera involucrar a factores como CTCF,

Kaiso o algunas MBDs en el silenciamiento epigenético de *Rb*. Para contestar esta pregunta lo que se hizo fue: extraer ADN genómico de cada una de las líneas celulares, tratarlo y modificarlo con bisulfito de sodio y secuenciar al menos 10 clonas de cada una para conocer el comportamiento poblacional de la metilación. La metodología detallada se encuentra en el anexo de material y métodos.

En la figura 27 se muestra un esquema que representa los 27 CpG contenidos en el promotor del gen *Rb* clonado y están señalados los dos CpG del sitio de unión de CTCF que fueron mutados. En el panel A se muestran las clonas K562 con el promotor del gen *Rb* intacto cultivadas durante 100 días y se aprecia que el promotor se mantuvo prácticamente no metilado, no obstante el tiempo de cultivo. En el panel B se muestra el perfil de metilación de dos clonas K562-pERbmutE (clona 1112 y clona 2111) a los 30 y 100 días. Se observa que la metilación del ADN en el promotor aumentó significativamente con el tiempo, lo cual sugirió indirectamente que CTCF es necesario para mantener activo al promotor y que por lo tanto su ausencia, favorece el silenciamiento, en parte por promover o no impedir la metilación del ADN.

en el promotor del gen *Rb* disminuyó en promedio un 20%. En particular, la clona 1112 con el promotor 48.1% metilado disminuyó a 34.3%. Así mismo, la clona 2111 con el promotor 26.8% metilado disminuyó a 7.3% y finalmente la clona 2102 con 39.2% metilado disminuyó a 10.7%. Estos resultados confirman que la metilación del ADN está íntimamente ligada al silenciamiento epigenético, en este caso del promotor del gen *Rb*. En la figura 28 se muestran las dos clonas que fueron tratadas con 30 μ M de AZA a los 30 días de cultivo y además se incluyó otra de las clonas independientes que también se muestra en la figura 26.

4.5.5. La ausencia de CTCF correlaciona con el silenciamiento del promotor del gen *Rb* en líneas celulares de glioma

Por otra parte, para contribuir en el conocimiento de los mecanismos de inactivación de genes supresores de tumores, en particular del gen *Rb*, fue nuestra intención conocer si en un contexto anormal, como en el caso de los gliomas, la expresión del gen *Rb* está des-regulada y si esta alteración pudiera ser por el silenciamiento epigenético del promotor, específicamente debido a la metilación del ADN.

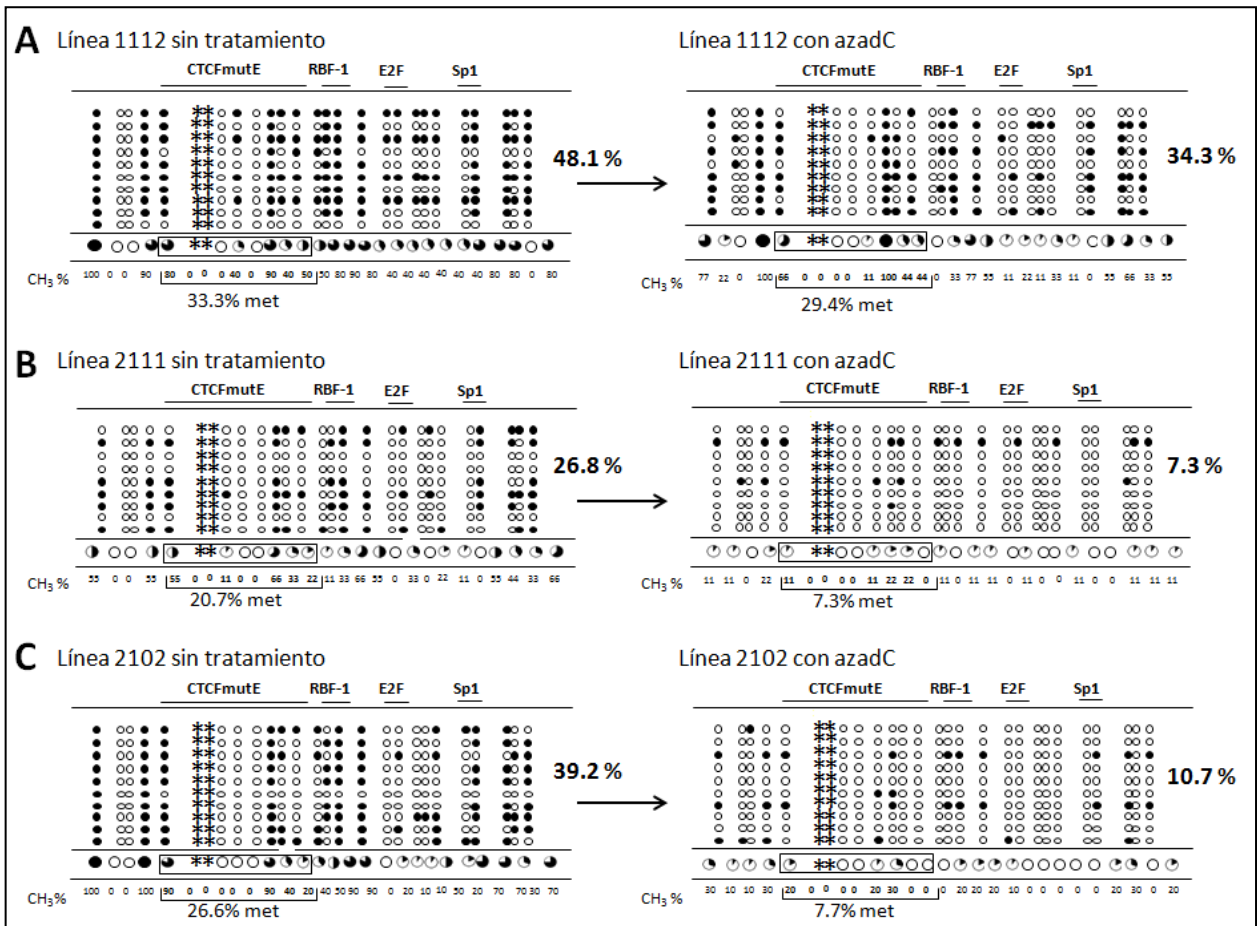


Figura 28. Perfiles de metilación del promotor del gen *Rb* en las clonas establecidas pERbmutE posterior al tratamiento con AZA. **A-** Línea 1112, **B-** Línea 2111 y **C-** Línea 2102. En los tres casos se observa disminución de la metilación en la región analizada del promotor del gen *Rb*. Cada círculo representa un nucleótido CpG del promotor del gen *Rb*. Negro: Metilado y Blanco: No metilado, **: CpG mutados.

Entonces, esta caracterización se empezó analizando los niveles de proteína pRb mediante Western Blot en diferentes líneas celulares de gliomas: U373MG, SH-SY5Y y T98G y como control positivo de la expresión de *Rb* se utilizó la línea celular eritroleucémica humana K562. En la figura 29A se observan similares cantidades de proteína en las células U373MG y SH-SY5Y, en contraste con lo que ocurre en las

células T98G, donde se ve una disminución de la abundancia relativa de la proteína pRb. El siguiente nivel por abordar fue definir los niveles la expresión del gen *Rb* vía RT-PCR semi-cuantitativa y corroborar si hay correspondencia con la cantidad de proteína en todos los casos. Los resultados de este análisis confirmaron que la disminución de proteína es congruente con la disminución del ARN mensajero en las muestras de gliomas (Figura 29B).

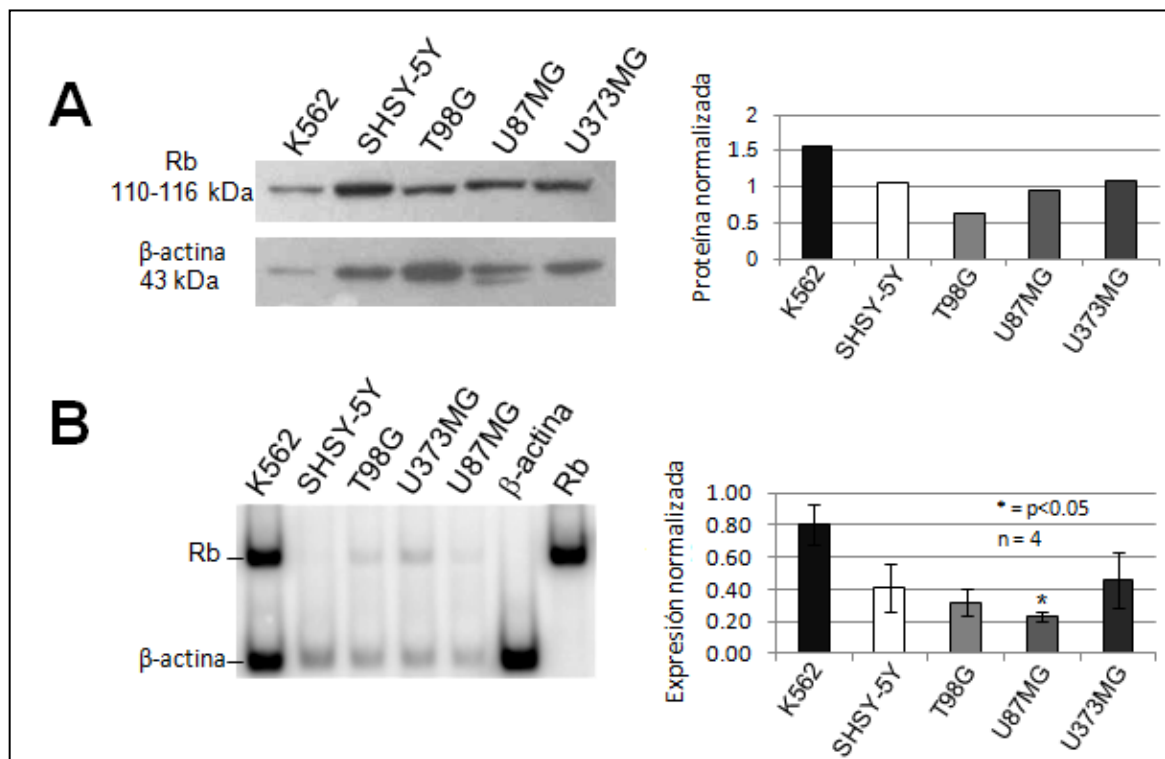


Figura 29. Concentración relativa de la proteína Rb y perfiles de expresión del gen *Rb* en líneas celulares. **A-** Análisis por Western Blot y **B-** por RT-PCR que demuestran las diferencias en los niveles de proteína y de transcrito en las líneas celulares SHSY-5Y, T98G, U87MG, y U373MG. Las líneas T98G y U87MG son las que mostraron tener los niveles más bajos de proteína y mensajero, respectivamente.

El siguiente cuestionamiento que resolvimos fue respecto a cómo se encuentra la metilación del ADN en la región del promotor del gen *Rb* en estas líneas celulares y para ello se realizó el tratamiento del ADN con bisulfito de sodio y posterior secuenciación, que nos diría si las disminuciones en la expresión del gen, ocurren por causa de la presencia de metilación en el promotor del gen *Rb*. Elegimos estos sistemas celulares (gliomas) porque datos en la literatura sugieren fuertemente que *Rb* se encuentra silenciado epigenéticamente con mayor frecuencia en diferentes tipos de cáncer de cerebro. En el análisis de la línea celular de glioma U87MG (Figura 30) se encontró un porcentaje de metilación en el promotor de *Rb* de 29%, que es mayor al encontrado en las células K562 (7.4%, Figura 27A) las cuales se sabe que expresan el gen en niveles normales. Este resultado nos llevó a pensar que la metilación del ADN puede ser, en parte, la causa de la mínima expresión del gen *Rb*. Sin embargo, también sugirió que no es el único mecanismo, si no que puede ser parte de una red coordinada de mecanismos epigenéticos necesarios para regular o silenciar la expresión de genes en tiempo y espacio, tanto en condiciones normales o en contextos anormales tales como el cáncer. Por lo que creemos primordial investigar qué otros componentes participan en la inactivación epigenética de este gen. Por tal razón, se realizó un ensayo de ChIP, con la finalidad de demostrar *in vivo* la presencia de CTCF, Kaiso, MBD2, MeCP2 y la incorporación de la marca represora H3K27me3, así como la acetilación global de las histonas H3 y H4. Independientemente del resultado, la intención fue comparar este contexto *in vivo* con el sistema generado en el laboratorio con las células HeLa y K562.

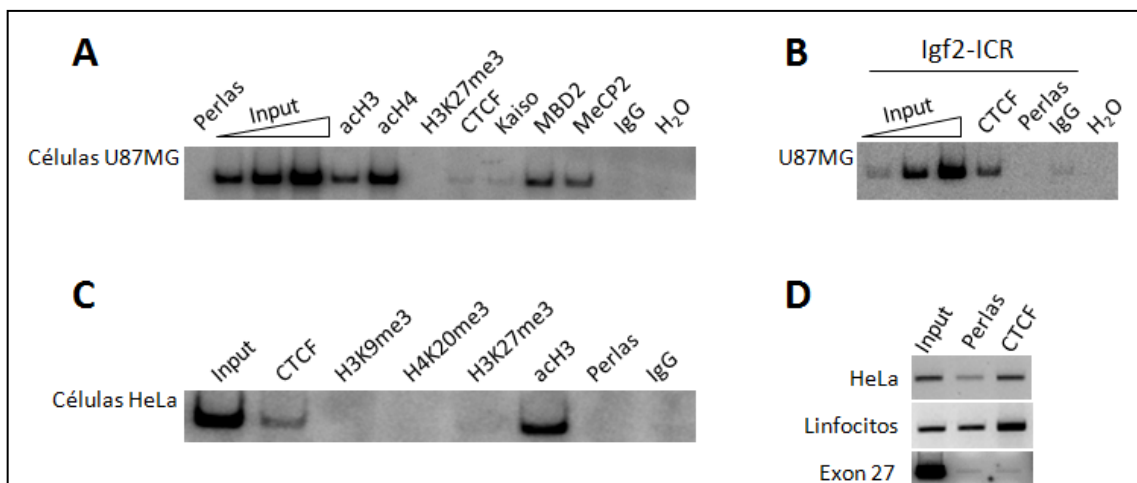


Figura 31. Estructura de la cromatina de la región del promotor del gen *Rb* en las líneas celulares de glioma U87MG (A y B) y de cervix humano HeLa (C y D). **A-** Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) donde se aprecia enriquecimiento de la acetilación general de las histonas H3 y H4. Enriquecimiento de las proteínas de unión a ADN metilado MBD2 y MeCP2. Así como ausencia de las proteínas CTCF y KAISO y de la marca H3K27me3. **B-, C- y D.-** son los controles de cada anticuerpo utilizado.

4.6. Conclusiones

Con todos estos resultados podemos concluir lo siguiente:

- La expresión del gen *Rb* se regula principalmente por metilación del ADN de su promotor, aunque no es el único mecanismo y no se descarta la participación de otros factores epigenéticos.

Como mencioné antes, los otros factores epigenéticos que podrían estar contribuyendo en la regulación del gen *Rb*, y que aún no se puede descartar su participación dados los resultados de la primera parte, son los complejos PcG. La sugerencia de estos dos componentes, además de por estos resultados, está basada en las evidencias cada vez mayores de los mecanismos de regulación epigenética de otros genes supresores de tumores como BRCA1, p16, VHL, entre otros [Aguilo *et al.*, 2011]. Por otro lado, los ARNs no-codificantes, en particular micro ARNs son componentes a los cuales se les ha demostrado de diversas formas su participación en la regulación epigenética de procesos importantes de la fisiología celular [Neal *et al.*, 2010; Brower, 2011; Xu *et al.*, 2011].

- CTCF es importante en la protección contra la metilación anormal del ADN y su ausencia acelera el proceso de silenciamiento epigenético.

Este hallazgo es relevante dado que concuerda con un gran número de investigaciones donde se demuestra el papel de CTCF en la protección contra la metilación del ADN. Por otra parte, también existen datos de CTCF como organizador de la topología nuclear, papel que por el momento, nosotros no investigamos, pero que evidentemente es un área que nos interesaría abordar. Como se muestra en la figura 32, en la vecindad del gen supresor de tumores *Rb*, la distribución genómica de CTCF tiene comportamiento periódico, señalado en la figura con las flechas rojas. Lo cual apoya la idea de que en este *locus* CTCF pueda tener funciones clave en la organización nuclear de la cromatina a nivel cromosómico y de esta manera contribuir con los patrones de expresión adecuados del gen *Rb*.

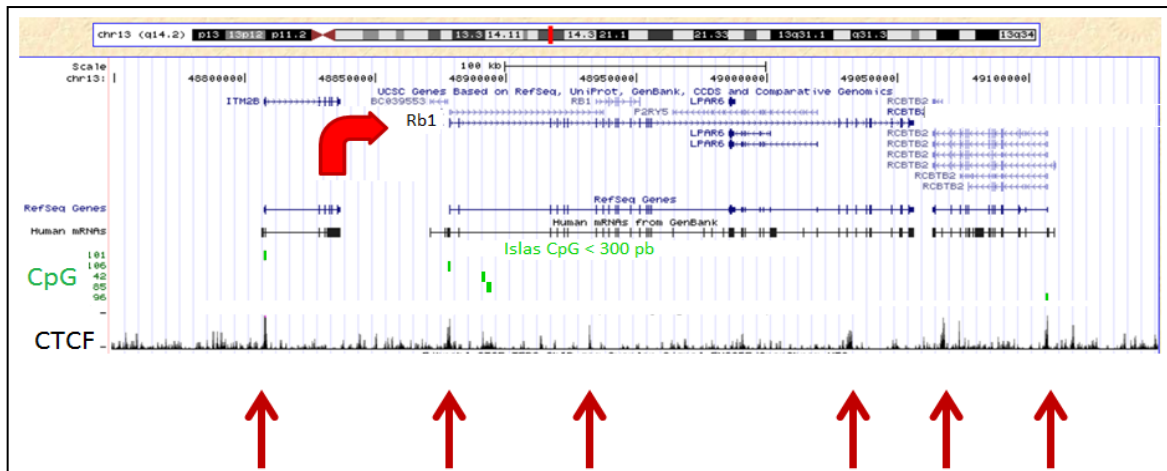


Figura 32. Entorno genómico y localización cromosómica del gen supresor de tumores *Rb*. Se muestra al gen *Rb* señalado con una flecha grande roja y a los genes aledaños. En la parte central se pueden ver unas cajas verdes que representan las islas CpG asociadas al gen y en la parte inferior se representan los sitios de enriquecimiento del factor CTCF señalado con flechas verticales.

- No se encontró que las modificaciones post-traduccionales de las histonas participen de manera relevante, por lo menos en la región promotora analizada.

Sin embargo, para conocer cual es su contribución real, es necesario estudiar contextos *in vivo* probablemente en otros sistemas modelo y/o contextos donde se abarque una región de análisis mayor, tal que nos permita ver un panorama de interacciones y cambios genómicos más completo con una óptica mucho mas detallada.

- Los resultados *in vitro* de las líneas generadas en el laboratorio, son consistentes con lo encontrado en la línea celular de glioma U87MG.

Estos hallazgos junto con lo anterior que ya he mencionado, me hacen pensar que es pertinente y necesario avanzar hacia el estudio y análisis incluso de muestras provenientes de pacientes. Cabe mencionar en este momento, que se ha empezado una colaboración con un grupo de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana y la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Siglo XXI, del IMSS, para estudiar muestras de miembros de una familia con Retinoblastoma y con otros tumores asociados. En este estudio tenemos resultados preliminares muy interesantes respecto a los patrones de metilación encontrados. Aunque son resultados que se tienen que corroborar y concretar la estandarización de las técnicas, estamos optimistas en el hecho de que podemos encontrar mucha información en relación al promotor del gen *Rb*.

4.7. Perspectivas

Con base a los resultados obtenidos, surge la necesidad de plantear nuevas preguntas que nos ayuden a explicar todos aquellos procesos que tienen que coordinarse y ocurrir en un momento celular dado para regular la expresión de un gen. En lo particular, a nosotros nos interesa conocer como ocurre en un contexto patológico como el cáncer. Es por eso que un abordaje que se sugiere inmediato para continuar con esta línea de investigación, es analizar la participación de los microARNs y de los ARNs no-codificantes, además sería importante incluir otros aspectos como la organización nuclear así como extender el estudio a otros miembros de la vía p16/Rb/E2F. Además, se podría correlacionar con procesos fisiológicos como el ciclo celular, dados los resultados de la primera parte de este estudio, donde avanzamos en esta dirección.

Probablemente algún acercamiento a largo plazo podría ser indagar sobre los cambios epigenéticos en ciertos genes específicos, no solo GST, también podrían ser oncogenes y algunos genes clave del metabolismo celular, todo esto durante el proceso de carcinogénesis en un modelo de cáncer murino o en roedores donde se tengan ya bien definidas las etapas y marcadores bioquímicos para tomarlos como referencia.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Líneas celulares

En esta investigación se trabajó con las siguientes líneas celulares:

<i>NOMBRE</i>	<i>K-562</i>	Número ATCC	CCL-243
Características	Propagación	Subcultivo	Almacenamiento
<i>Homo sapiens</i> (humano)	El medio base para esta línea celular es Iscove's Modified Dulbecco's MédiuM. Para hacer medio completo se adiciona lo siguiente: suero fetal bovino a una concentración final de 10 %	Protocolo: Los cultivos se mantienen por la adición o reemplazo con medio fresco. Nuevos cultivos se empiezan con $1 \cdot 10^5$ células viables/mL y se mantienen con $1 \cdot 10^6$ células/mL.	Medio de congelación: Medio de crecimiento complete 95%; DMSO, 5%
Propiedades de crecimiento:	penicilina estreptomycin a una concentración final de 1 %	Cambio de medio: cada 2 a 3 días	Temperatura de almacenamiento: nitrógeno líquido
Suspensión	Temperatura: 37.0°C		
Morfología: linfoblasto	Atmosfera: aire, 95%; dióxido de carbono (CO ₂), 5%		
Fuente: Organo: medula osea			
Enfermedad: chronic myelogenous leukemia (CML)			

Tumorigenica: si Expresión de antígeno: CD7 (25%) Edad: 53 años Género: Mujer			
---	--	--	--

<i>NOMBRE</i>	<i>HeLa</i>	Número ATCC	CCL-2
Características	Propagación	Subcultivo	Almacenamiento
<p><i>Homo sapiens</i> (humano)</p> <p>Propiedades de crecimiento: Adherente.</p> <p>Morfología: Epitelial.</p> <p>Fuente: Órgano: cervix</p> <p>Enfermedad: adenocarcinoma</p> <p>Género: Mujer</p> <p>Edad: 31 años</p> <p>Raza: negra</p>	<p>El medio base recomendado por ATCC para esta línea celular es ATCC-formulated Eagle's Minimum Essential</p> <p>En el laboratorio empleamos como medio base DMEM</p> <p>Para hacer medio completo se adiciona lo siguiente: suero fetal bovino a una concentración final de 10 % y penicilina/estreptomina a una concentración final de 1 %</p> <p>Atmosfera: aire, 95%; dióxido de carbono (CO₂), 5%</p> <p>Temperatura: 37.0°C</p>	<p>Protocolo:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Remover y descartar el medio de cultivo. 2. Brevemente lavar con PBS 1x estéril para remover las trazas de suero, el cual contiene inhibidores de la tripsina. 3. Adicionar 2.0 a 3.0 ml de solución de Trypsin-EDTA incubar 5 minutos a 37°C 4. Adicionar el volumen equivalente de medio complete para inactivar la tripsina. 5. Después de este paso, las células se pueden diluir o expandir o preparar para 	<p>Medio de congelación: Medio de crecimiento completo 95% suplementado con DMSO, 5%</p> <p>Temperatura de almacenamiento: nitrógeno líquido</p>

		congelar Relación de subcultivo: Es recomendado subcultivar en una proporción de 1:2 a 1:6 Cambio de medio: de 2 a 3 veces por semana.	
--	--	--	--


<i>NOMBRE</i>	<i>U-87 MG</i>	Número ATCC	HTB-14™
Características	Propagación	Subcultivo	Almacenamiento
<p><i>Homo sapiens</i> (humano)</p> <p>Propiedades de crecimiento: Adherente</p> <p>Género: Mujer Edad: 44 años Raza: Caucásica</p> <p>Organo: cerebro Etapa del tumor: clasificado como grado IV Enfermedad: glioblastoma; astrocitoma Tumorigenica: Sí Expresión de antígeno sanguíneo: Tipo A, Rh+</p>	<p>El medio base recomendado es ATCC-formulated Eagle's Minimum Essential Medium, adicionado con suero fetal de bovino a una concentración final de 10%.</p> <p>Atmosfera: 5% en aire Temperatura: 37.0°C</p>	<p>Se recomienda una relación de subcultivo de 1:2 a 1:5</p> <p>Cambio de medio: 2 a 3 veces por semana</p> <p>Protocolo: Remover el medio y lavar con PBS 1x estéril. Remover la solución y adicionar 1 a 2 ml de solución de tripsina-EDTA, incubar a 37° C hasta que las células se despeguen. Después de este paso, las células se pueden diluir o expandir o preparar para congelar Incubar cultivos a 37°C.</p>	<p>Medio de cultivo, 95%; más DMSO, 5%</p>

<i>NOMBRE</i>	<i>T98-G</i>	Numero ATCC	CLR-1690™
Características	Propagación	Subcultivo	Almacenamiento
<p><i>Homo sapiens</i> (humano)</p> <p>Propiedades de crecimiento: adherente</p> <p>Morfología: fibroblastos</p> <p>Organo: Cerebro</p> <p>Efermedad: glioblastoma multiforme</p> <p>Tumorigenica: NO</p> <p>Esta es una línea celular con Hiperpentaploidia</p> <p>Edad: 61 años</p> <p>Género: masculino</p> <p>Etnia: Caucásico</p>	<p>El medio base es ATCC-formulated Eagle's Minimum Essential Medium, adicionado con suero fetal de bovino a una concentración final de 10%.</p> <p>Temperatura: 37.0°C</p>	<p>Se recomienda una relación de subcultivo de 1:3 a 1:10</p> <p>Cambio de medio: 2 a 3 veces por semana</p> <p>Protocolo: Remover el medio y lavar con PBS 1x estéril. Remover la solución y adicionar 1 a 2 ml de solución de tripsina-EDTA, incubar a 37° C hasta que las células se despeguen. Después de este paso, las células se pueden diluir o expandir o preparar para congelar</p> <p>Incubar cultivos a 37°C.</p>	<p>Medio de cultivo, 95%; más DMSO, 5%</p>

NOMBRE		SH-SY5Y Es la tercer sub-clona de la línea SK-N-SH		Número ATCC HTB-11™	
Características	Propagación	Subcultivo	Almacenamiento		
<p><i>Homo sapiens</i> (humano)</p> <p>Propiedades de crecimiento: adherents</p> <p>Morfología: epithelial</p> <p>Organo: cerebro</p> <p>Enfermedad: neuroblastoma</p> <p>Sitio metastásico: médula ósea</p> <p>Expresión de antígeno sanguíneo: Tipo A, Rh+</p> <p>Esta línea celular es hiperdiploide</p> <p>Edad: 4 años</p> <p>Genero: femenino</p>	<p>El medio base es ATCC-formulated Eagle's Minimum Essential Medium, adicionado con suero fetal de bovino a una concentración final de 10%.</p> <p>Temperatura: 37.0°C</p>	<p>Se recomienda una relación de subcultivo de 1:3 a 1:8</p> <p>Cambio de medio: 1 a 2 veces por semana</p> <p>Protocolo: Remover el medio y lavar con PBS 1x estéril. Remover la solución y adicionar 1 a 2 ml de solución de tripsina-EDTA, incubar a 37° C hasta que las células se despeguen. Después de este paso, las células se pueden diluir o expandir o preparar para congelar</p> <p>Incubar cultivos a 37°C.</p>	<p>Medio de cultivo, 95%; más DMSO, 5%</p>		

5.2. Metodologías

Tratamiento con bisulfito de sodio

1. Prender 3 baños con las siguientes temperaturas: 95°, 37° y 50°
2. Preparar NaOH 10N (0.8g en 2mL de H₂O).
3. Preparar [] Hidroquinona 100mM (sigma, H9003). Pesar 0.110 g de HQ y disolverlos en 10 mL de H₂O bidestilada.
4. Diluir la HQ 1:10. Con 1 mL total es suficiente. 100 µL de HQ + 900 µL de H₂O bidestilada.
5. Preparar NaOH 3N: 300 µL de NaOH 10N + 700 µL de H₂O.
6. Preparar bisulfito de sodio 3M (sigma, S9000). Pesar 6.366 g de Bisulfito y disolverlos en 20 mL de H₂O bidestilada. Ajustar pH=5 con NaOH 10N (agregar 380-400 µL de NaOH 10N).
7. Mezclar de 1 a 3 µg de DNA previamente digerido¹ con H₂O en un volumen de 18 µL de H₂O.
8. Desnaturalizar el DNA adicionando 2 µL de NaOH 3N e incubar 5 min a 37°C (máximo 15 min).
9. Calentar 2 min a 95°C y pasar inmediatamente a hielo. Incubar de 2 a 5 min.
10. Centrifugar 10 seg a máxima velocidad.
11. Para llevar a cabo la sulfonación y deaminación hidrolítica adicionar inmediatamente al DNA desnaturalizado (20 µL) lo siguiente:
 - a. HQ 12 µL
 - b. Bisulfito pH=5 208 µL
 - c. Aceite mineral 150 µL
12. Incubar en obscuridad “over night” (12-16 h) a 50°C.
13. Descartar el aceite mineral congelando la mezcla a -70°C por 30 min o 1 h.
14. Remover el bisulfito por “Desalting”, utilizar las columnas Wizard (Promega, A7280).

¹ Este paso es opcional. Clark et al., 2006 recomiendan que el DNA sea menos a 2 kb para una eficiente desnaturalización. Esto se hace con una enzima adecuada, es decir, que no corte la región de interés o por sonicación.

15. Para llevar a cabo la desulfonación alcalina, agregar 5.5 μL de NaOH 3N.
16. Incubar 15 min a 37°C.
17. Precipitar el DNA adicionando 300 μL de EtOH 100% frio + 33.33 μL de acetato de amonio pH=7 + 1 μL de glicógeno (20 μg). Incubar de 2 a 4 h a -70°C.
18. Centrifugar 15 min a 4°C.
19. Lavar con 300 μL EtOH 70% frio.
20. Dejar secar el pellet y resuspender en 30 μL de H₂O bidestilada.
21. Almacenar a -20°C.
22. Analizar por PCR.

Análisis de ADN por Southern blot

DIA 1

Preparación de la muestra

1. Partir de 10 a 50 μg de DNA por muestra

Delimitar la región de estudio con una digestión enzimática (usar entre 1 unidad y 1.5 unidades de enzima por cada μg de DNA. Digerir “over night” (si la enzima lo permite)

DÍA 2

Purificación del DNA

2. Purificar el DNA mediante una extracción fenol/cloroformo
3. Dejar secar bien el pellet y resuspender muy bien en 20 μL de H₂O

Electroforesis de DNA

1. Correr las muestras en un gel de agarosa 1% preparado con TBE 1X
2. Utilizar marcador de peso molecular marcado con ³²P previamente y uno no marcado
3. Correr a 100 Volts por aproximadamente 1 h o hasta que la banda con peso molecular de 500 del marcador haya salido del gel

Transferencia

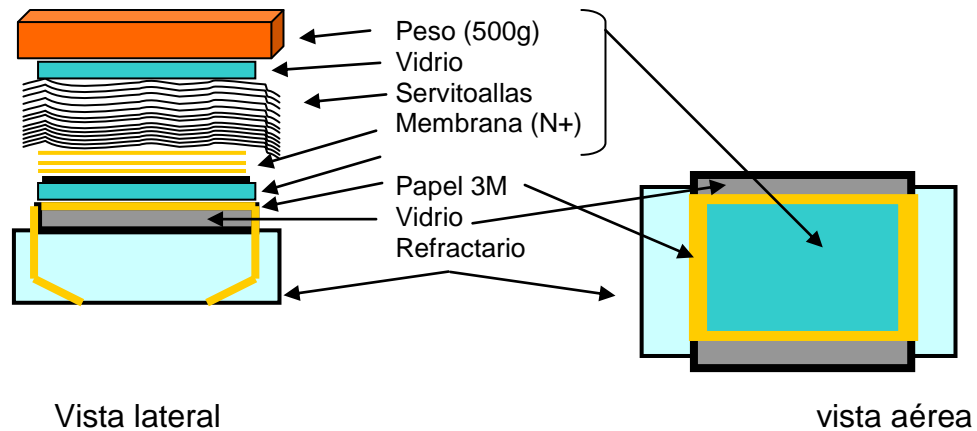
material

- 2 refractarios pirex (uno grande y otro chico)
- 2 vidrios gruesos
- 1 botella con 500 mL H₂O. (peso)
- Papel filtro 3M. (1 largo 4 cm mas ancho que el gel y 3 chicos del tamaño del gel)
- Membrana Hybond-N+ ó Hybond-XL (AMERSHAM RPN 303 s)
- Buffer de transferencia NaOH 0.5M (20 g en 1000 ml)
- Pipeta de 10 ml
- Egapack (polietileno)
- Servi-toallas, dobladas de forma que cubran al gel, una pila de 10 cm

Procedimiento

1. Montar el vidrio sobre el refractario
2. Colocar el papel filtro grande que cuelgue al interior y hasta el fondo del refractario
3. Agregar el NaOH 0.5M 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
 - Incubar el gel en NaOH 0.5M durante 20 minutos, colocar el gel sobre el papel filtro que esta sobre el vidrio (Humedecer antes la superficie del papel y sacar las burbujas que queden entre el papel y el vidrio con la pipeta)
4. Colocar la membrana sobre el gel
5. Sacar la burbujas que queden entre la membrana y el gel
6. Rodear con egapack de tal manera que únicamente la membrana haga contacto con el gel de agarosa
7. Colocar 3 papeles filtro, de uno en uno, previamente mojados en NaOH sacando las burbujas que queden entre ellos

8. Colocar las servi-toallas, el vidrio y encima el peso
9. Dejar transfiriendo "over night"
10. Marcar radiactivamente 50ng de sonda GFP



Marcaje de sonda para Southern blot.

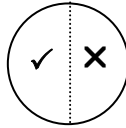
Estuche para marcar la sonda por Randon Primer (Invitrogen 18187-013):

1. En un tubo de 1.5mL colocar 4 μ l de sonda (50 ng totales)
2. Llevar a 15 μ l con H₂O inyectable
3. Hervir la muestra por 5 min.
4. Incubar en hielo por 3 min
5. Darle un pulso de centrifugación
6. Adicionar lo siguiente a la reacción:
 - 2 μ l de dATP
 - 2 μ l de dGTP
 - 2 μ l de dTTP
 - 15 μ l de Random Primer Mix buffer
 - 6 μ l de dCTP marcado
 - 8 μ l de H₂O
7. Mezclar con la pipeta sin hacer burbujas
8. Pulso de centrifugación
9. Agregar 1 μ l de Klenow, mezclar y centrifugar

10. Incubar de 4 a 12 horas a 25 °C
11. Agregar 5 µl de buffer STOP
12. Medir el porcentaje de incorporación

Cuantificación del % de incorporación de la sonda

- 1.- Hacer una dilución de la sonda (1:100). 1 µl de la sonda + 99 µl de H₂O (sol.1)
- 2.- Dividir en dos partes un un papel circular Whatman (Whatman DE81, Cat 3658325) y agregar 2 µl de la solución 1 en cada lado del papel. Dejar secar



Las marcas significan que lado del papel lavar y cual no

3.- La mitad se lava como sigue:

- A) 3 lavados de 5 minutos con Na₂HPO₄ 0.5M
- B) 2 lavados de 1 minuto con H₂O
- C) 2 lavados de 1 minuto con Etanol al 96° (industrial)

4.- Para los lavados se recomienda agregar en cajas petri de 5 a 10 ml de cada solución y pasar el papel de caja a caja (también se pueden usar las tapas)

5.- Dejarlo secar y determinar las cuentas de radioactividad en un contador de centelleo

NOTA: El valor en cpm del papel no lavado es el 100%, el papel lavado será igual a tu % de incorporación

Una sonda bien marcada tiene un porcentaje de incorporación igual o mayor a 70%

De no ser así, el problema puede estar en:

- El kit de marcado
- La cantidad de sonda que hay que marcar
- La desnaturalización de la sonda

Limpieza de Sonda por columna MicroSpin G-50

1. Resuspender la resina en la columna dándole vortex gentilmente
2. Abrir la tapa ¼ de vuelta y desprender la parte de abajo
3. Colocar la columna en un tubo eppendorf

4. Centrifugar la columna por 1 min. a 737x g (3000rpm en un rotor de 73 mm)
Comenzar a medir el tiempo al mismo tiempo que se prende la microcentrifuga
(NO DAR PULSO)
5. Colocar la columna en un nuevo tubo eppendorf
6. Añadir la sonda (en un volumen de 50 μ l) al centro de la cama inclinada de resina.
7. Centrifugar por 2 min. a 737g
8. Tirar la columna en los desechos radiactivos

Marcaje de escalera (Cinasa Promega)

1. Añadir a un tubo:
 - 2 μ l de escalera
 - 2 μ l de buffer
 - 2 μ l de cinasa
 - 2 μ l de gamma 32 ATP
 - 13 μ l de H₂O
2. Incubar 30 min. a 37 °C
3. Inactivar 10 min. a 68 °C
4. Medir CPMs

DIA 3

- Desmontar el “sándwich” y “croslinkear” la membrana pulsar autocroslink en el equipo
- Marcar el lado donde están los ácidos nucleicos

Pre-hibridación e hibridación.

1. Después de la transferencia desarmar y pasar la membrana a SSC2X (200ml), de 20seg a 1min
2. Meter a un tubo en el horno de hibridación previamente calentado a 65°C, con solución de pre-hibridacion

3. Pre-hibridar 1 hora a 65°C con agitación constante (rotación de 4-6 según se prefiera)
4. Desnaturalizar la sonda a 98°C por 5 minutos justo antes de agregarla
5. Incubar en hielo por 3 minutos
6. Agregar la sonda desnaturalizada al tubo de hibridación
7. Hibridar en el horno rotatorio de 12 a 24 horas
8. Lavar de la siguiente manera:

DIA4

Lavado de membrana

9. Enjuagar con 50 ml de buffer 1 precalentada a 65°C
10. Lavar con 50 ml de buffer 1 precalentada a 65°C por 30 minutos
11. Enjuagar con 50 ml de buffer 2 precalentada a 65°C
12. Lavar con 50 ml de buffer 2 precalentada a 65°C por 30 minutos
13. Envolver en egapack (sin que queden arrugas)
14. Exponer en un cassette de "over night" o exponer con una película autoradiográfica a -70°C
15. Revelar el resultado

DIA5

Revelado de film

1. Sacar el cassette del revco y dejarlo por 10 minutos a Temperatura ambiente
2. Poner en bandejas el fijador, agua y revelador
3. En oscuridad, sacar el film del cassette y ponerlo en la bandeja con revelador
4. Esperar a que aparezca la señal (no más de un minuto)
5. Enjuagar en el H₂O
6. Poner en el fijador hasta que se ponga transparente el film
7. Enjuagar el film con H₂O corriente
8. Dejar secar

9. Enjuagar bandejas con H₂O y guardar sustancias

Desnudado de membrana

1. Lavar en el horno de hibridación a 65°C por 2 o 3 veces durante 20 minutos con SDS 0.1% en ebullición
2. Checar en un cassette de el STORM que haya quedado limpio

Soluciones

Solción Denhart

Agregar los componentes en orden y esperar a que se disuelvan antes de agregar el que sigue.

BSA 2g

Ficoll 2g

Polivinilpirrolodona 2g

Llevar a 200ml con H₂O estéril

Alicuotar yguardar a -20°C

Solución de pre-hibridación

SSC 20X 6 mL

Denhart 2 mL

SDS 10X 2 mL

H₂O 11mL

Esperma de salmón desnaturalizado
60µl (5 min hirviendo + 3min en
hielo, añadir a la mezcla cuando ya
está a 65°C)

Lavado de membrana

Buffer 1

10 mL SSC 20X

1 mL SDS 10%

Llevar a 100 mL

Buffer 2

0.75 mL SSC 20X

1 mL SDS 10%

Llevar a 100 mL

Solución SSC 20x

NaCl 175g

Citrato de sodio 88.2g

Disolver en 800mL de H₂O

Ajustar pH a 7 con NaOH

Llevar a 1L con H₂O

Na₂HPO₄

Na₂HPO₄ 35.49g

Disolver y llevar a 500mL con H₂O

Extracción de DNA genómico

1. Centrifugar 1mL de células (3×10^6 aprox)
2. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 250 μ L de mix I
3. Lisar las células añadiendo 250 μ L de mix II complementado con 50 μ g/mL de RNasa A + 50 μ g/mL de Proteinasa K
4. Incubar a 50°C desde 4 h hasta over night
5. Adicionar 500 μ L de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y dar vortex por 3 min
6. Centrifugar a 13 000 rpm por 10 min y recuperar la fase acuosa (la de arriba) en un tubo nuevo
7. Limpiar una vez con 500 μ L cloroformo
8. Recuperar la fase acuosa (la de arriba) en un tubo nuevo
9. Adicionar 500 μ L de isopropanol hasta ver el pellet
10. Centrifugar a 13 000 rpm por 10 min y retirar cuidadosamente el sobrenadante
11. Lavar el pellet con 500 μ L con de etanol 70 % frio
12. Centrifugar a 13 000 rpm por 10 min y retirar cuidadosamente el sobrenadante
13. Dejar evaporar el alcohol residual
14. Resuspender el pellet (DNA) en 50 μ L de H₂O inyectable
15. Cuantificar el DNA

Mix I	Mix II
200 mM de Tris pH 8.5	0.4 % de SDS
400 mM de NaCl	10 mM de EDTA
	50 μ g/mL de RNasa A (stock 5 mg/mL)
	50 μ g/mL de Proteinasa K (stock 10 mg/mL)

Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (CHIP) de Miles Braun

Tipos celulares en suspensión: HD3, 6C2, DT40, K562.

1. Obtener un cultivo de células con un 80 a 90% de confluencia. Con 100 millones de células es suficiente para 10 anticuerpos (10 millones por anticuerpo).
2. Para contar se toman 10 μ l del cultivo y 40 μ l de azul. Contar cuatro cuadros de la cámara de Neubauer.
(Promedio) (50,000)= num. de células/ml.
En un cuadro se cuantifica 0.1 μ l. Esto por 10,000 nos da el número de células en 1 ml, por el factor de dilución en este caso 5.
3. Si se utilizarán otros tipos celulares: (RBC, HeLa, Fibroblastos, etc) cuantificar la cantidad de proteína obtenida después de sonicar y ajustar a 1 μ g/ μ l. Se utilizan 400 μ g de cromatita por IP.
4. Centrifugar 5 min a 1,200rpm 4°C.
5. Lavar dos veces con PBS con SFB al 2%, 20 ml por cada Falcon de 50ml y centrifugar por 5 min a 1200 rpm a 4°C.
6. Resuspender las células en 30ml de PBS. Si hay más de un tubo juntar las células en un solo tubo una vez resuspendidas. Se incuba el cultivo celular con formaldehído al 1% del total del volúmen (3ml de formaldehído al 11%) en PBS durante 10min a RT.
7. Añadir solución de glicina a una concentración final de 125mM (1.5ml de Glicina 2.5M) para detener el "crosslinking" y agitar los tubos suavemente y centrifugar por 5 min a 1200 rpm a 4°C.
8. Se lavan las células dos veces con 35ml de PBS 1X frío. Centrifugar cada vez a 1200rpm por 5min a 4°C.
9. Resuspender las células en 1ml Buffer de lisis, pasar las células a un falcon de 10ml e incubar en hielo por 10min. Nota: el buffer de lisis debe tener los inhibidores de proteasas.

Para las células en suspensión:

10. Sonicar hasta obtener fragmentos deseados. Para obtener fragmentos de 300 a 400pb se sonica con 12 pulsos de 30 segundos cada uno (35% de amplitud) con un periodo refractario en hielo de dos minutos (siempre mantener la muestra fría pero

evitar que se precipite el SDS). Evitar hacer burbujas y poner la punta del sonicador casi en el fondo del falcon.

Para otros tipos celulares:

11. Establecer las condiciones de sonicación purificando alícuotas en los diferentes pulsos para corroborar los tamaños de la cromatina obtenida.
12. Después de sonicar, centrifugar las muestras a 4°C por 10min a máxima velocidad en la centrífuga del refrigerador. Esta velocidad equivale a aprox. 11000g.
13. Recuperar el sobrenadante y guardar una alícuota de 30 a 50µl como INPUT.
14. Transferir sobrenadante a un tubo falcon y hacer una dilución 1:10 con el buffer de dilución (ya con los inhibidores de proteasas) para tener 10ml.
15. Si el tipo celular varía cuantificar la concentración de proteínas en la muestra y ajustar a 1µg/µl con buffer de dilución + inhibidores de proteasas. Por IP se utilizan 400µg.
16. Incubar la cromatina soluble por 2h a 4°C en agitación constante con:
17. a)20µl de suero humano + 20µl de proteína A/G mas agarosa (sin bloquear Santa Cruz)
18. b)50µl de proteína A/G previamente bloqueadas (Amersham) (ver más adelante).
19. Centrifugar a 3000rpm por 5 min a 4°C.
20. Colocar la cromatina soluble en tubos eppendorf (1ml por IP).
21. Agregar los anticuerpos específicos e incubar overnight a 4°C.

Bloqueo de proteínas A/G (Amersham):

22. Agregar a 2 ml de buffer 9:1 dilución:lisis con inhibidores de proteasas (1.8ml dilución + 0.2ml lisis) 0.2 gr de proteína A + 100 µl de proteína G.
23. Agregar 100µg/ml de BSA + 500 µg/ml de espermatozoos de salmón. Dejar rotando over night a 4°C.
24. Centrifugar a 4°C (800 rpm Labofuge 400R Heraeus) por dos minutos.
25. Enjuagar las perlas dos veces con 2 ml de buffer de dilución + Inhibidores de proteasas.

26. Resuspender las perlas en 2ml de buffer 9:1 dilución:lisis más inhibidores de proteasas.

Continua CHIP:

27. Se sacan las muestras del refrigerador y se añade a cada inmunoprecipitación 30µl de perlas. Se deja rotando de 2 a 4h a 4°C.
28. Se recuperan las perlas y se lavan secuencialmente por 10 min en los buffers Paro I, Paro II y Paro III (los tres con inhibidores de proteasas), centrifugando cada vez 1min a 2000rpm.
29. Lavar dos veces con buffer TE.
30. Sacar INPUT
31. Agregar a las perlas 150µl de la solución de lavado de perlas con 2µl de proteinasa K(10µg/µl) + 1µl de RNasa (5µg/µl) por muestra.
32. Incubar las muestras a 37°C por 1h + 65°C por 6h para revertir el crosslinking (se puede dejar overnight).
33. Extraer el DNA con las columnas de “miniElute Qiagen PCR kit purification”, eluyendo el DNA en un volúmen de 50µl.
34. Proceder a realizar las PCRs

SOLUCIONES

Solución de formaldehído al 11% para el crosslinking (preparar en el momento de usarlo y no guardarlo más de 2 semanas)

Agregar:	Concentración final
7.45ml de Formaldehído al 37%	Formaldehído al 11%
0.5ml NaCl 5M	0.1M NaCl
50µl EDTA 0.5M (pH8)	1mM EDTA
25µl EGTA 0.5M (pH8)	0.5mM EGTA
1.25ml Hepes (pH8)	50mM Hepes
15.75ml H ₂ O	

Buffer de Glicina (2.5M)

Agregar 18.7675g de Glicina a 100ml de agua MiliQ.

Buffer de Lisis (100ml)	Stock	Agregar
1% SDS	10% SDS	10ml
5mM EDTA	500mM	1ml
50mM de TRIS-HCl pH 8.1	1M	5ml

Agregar antes de usar: Inhibidores de Proteasas, fosfatasa y desacetilasas.

Buffer de dilución (500ml)	Stock	Agregar
1% de Tritón X-100	10% Triton X-100	10ml
2mM de EDTA	500mM EDTA	2ml
20mM Tris-HCl pH 8.1	1M	10ml
150mM de NaCl	5M	15ml

PMSF 100mM

0.01g en 1ml de isopropanol y guardarlo a -20°C. De esta solución agregar 10µl por cada 10ml de PBS

PBS 1X (1 Litro)

8g NaCl
0.2g KCl
1.44g Na₂HPO₄
0.24g KH₂PO₄

PBS con 2% de SFB

98ml PBS
2ml SFB
100µl de PMSF (100mM)

Inhibidores de Proteasas para el Buffer de lisis (5ml)

1µl de Leupeptina
0.1µl de aprotinina
50µl de Butirato de Sodio
50µl de PMSF
5µl de Bensamidina
5µl de Pepstaina

Inhibidores de Proteasas para el Buffer de dilución (20ml)

4µl de Leupeptina
0.4µl de aprotinina
200µl de Butirato de Sodio
200µl de PMSF

20µl de Bensamidina
20µl de Pepstaina

Nota: Estas cantidades son válidas cuando los inhibidores están en las siguientes concentraciones:

Leupeptina 1mg/ml
Butirato de Sodio 1M
Aprotinina 10mg/ml
PMSF 10mg/ml
Bensamidina 100mM
Pepstaina 1mg/ml

Solución de lavado de perlas

0.1M de Bicarbonato de Sodio (NaHCO₃)
SDS al 1%
Para esto agregar 0.841g de NaHCO₃ y 10ml de SDS al 10% y resuspender en 100ml de agua.

Buffer Paro I

0.1% SDS
1% Tritón x-100
2mM EDTA
20mM Tris-Hcl pH 8.1
150mM NaCl

Buffer Paro II

0.1% SDS
1% Tritón x-100
2mM EDTA
20mM Tris-Hcl pH 8.1

500mM NaCl

Buffer Paro III

0.25M LiCl

1% NP40

1% Deoxicolato

1mM EDTA

10mM Tris-Hcl pH8.1

Transfección transitoria

Material

1. Plásmidos:

- pCMV-Renilla
- pGLRb (luciferasa)
- pcDNA-HA-E2F6

Células HeLa

- 300 000 células/pozo
- son 5 condiciones (pGLRb, pGLRb+200 ng pcDNA-E2F6, pGLRb+400 ng pcDNA-E2F6, pGLRb+1 µg pcDNA-E2F6, pGLRb+pcDNA3.1) por triplicado: $3 \cdot 10^6$ células en total

DMEM con 10 % de suero fetal bovino y penicilina-estreptomicina 1%

Placas de cultivo de 6 pozos

Procedimiento

Día 1

1. Sembrar 300 000 células/pozo con 3 mL de DMEM (+) con Ab

Día 2

1. Por cada condición (Hacer Tubo Mix para 3 pozos):

- Plásmido 1 µg
- pCMV-Renilla 50 ng (plásmido con el promotor mínimo pRLmin)
- H₂O c.b.p 20 µL
- DMEM (-) 100 µL

2. Incubar 15 minutos

3. Diluir la LIPOFECTAMINA

- LIPOFECTAMINA 2 µL
- DMEM (-) 100 µL

4. Mezclar la LIPOFECTAMINA con los tubos del paso 1

5. Incubar 20 minutos

6. Mientras se incuba, quitar el medio de cada pozo
7. Lavar con 1 mL de PBS estéril, retirar el PBS
8. Adicionar **800 μ L** de DMEM (-) **sin antibiótico**
9. Adicionar el volumen correspondiente de la mezcla del paso 4 de cada condición a cada pozo
10. Incubar 6 horas
11. Adicionar a cada pozo 2 mL de DMEM (+) **con antibiótico** (para inactivar la lipofectamina)
12. Cosechar 48 h después de la transfección
 - a. Tripsinizar con 0.5 mL
 - b. Centrifugar a 13 000 rpm 1 min
 - c. Lisar con passive lysis buffer 5x
13. Leer en en luminómetro

Nota 1: La relación óptima DNA: Lipofectamina es: de 1:2 (1+1) a 1:3 (1+2)

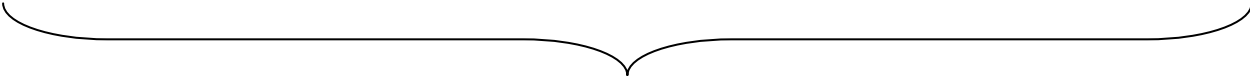
Nota 2: Todos los plásmidos deben estar a 0.5 μ g / μ L

Transfección E2F6 + EZH-2

CAJA	Mix - 3	Rb	Renilla	E2F6	EZH2 o ΔSET	Pi	pcDNA vac	H ₂ O
	Tubo							
1	Rb	6 μL	6 μL					18 μL
	pcDNA vac 3 μg	6 μL	6 μL				6 μL	12 μL
	Pi	6 μL	6 μL			3μL		15 μL
2	E2F6 1μg	6 μL	6 μL	6 μL				12 μL
	E2F6 2μg	6 μL	6 μL	12 μL				6 μL
3	EZH2 1μg	6 μL	6 μL		6 μL			12 μL
	EZH2 2μg	6 μL	6 μL		12 μL			6 μL
4	E2F61μg/ EZH2 2μg	6 μL	6 μL	6 μL	12 μL			
	ΔSET 1μg	6 μL	6 μL		6 μL			12 μL
	ΔSET 2μg	6 μL	6 μL		12μL			6 μL
5	E2F61μg/ EZH2ΔSE T 2μg	6 μL	6 μL	6 μL	12 μL			
	Volumen							total c/t

	DMEM	LIPO	TOTAL	Mix p/ 3 TUBOS
35 tubos	3.5 mL	70 μL	3570 mL	306 μL
30 tubos	3mL	60 μL	3060 mL	306 μL

40 tubos	4	80		306 μL
25 tubos	2.5	50	2550	306 μL



Mezclar con tubos DNA (30 μ L)
Adicionar a cada pozo 112 μ L
Incubar 5 h
Adicionar 2 mL DMEM (+)
COSECHAR A LAS 48 HORAS



Ensayo de Cambio de la Movilidad Electroforética (EMSA)

Preparación de extractos celulares totales

1. Cosechar las células.
2. Lavarlas una vez con 1 mL de PBS frío. Centrifugar 2 min a 13000 rpm a 4°C
3. Descartar el sobrenadante.
4. Adicionar 100 µL de buffer de lisis celular frío y resuspender con la pipeta, al menos 10 veces.
5. Incubar 30 minutos en agitación a 4°C
6. Centrifugar 10 min a 13000 rpm a 4°C
7. Recuperar el sobrenadante y hacer alícuotas de 30 µL
8. Congelar inmediatamente a -80°C
9. Dejar una alícuota de 10 para medir el contenido de proteína.

Ensayo de unión de DNA

1. Para cada muestra hacer un coctel con los siguientes reactivos:
 - Shift Buffer 2.5 µL
 - BSA 1 µg/µL 1.5 µL
 - Poli dI•dC 1 µL
 - Sonda 1 µL (20000 cpm)
2. El volumen de la muestra de proteína debe ser de 8 µL (ajustar con agua)
3. Mezclar la proteína con el coctel e incubar 30 min a T amb
4. Para competencias o super retardos adicionar 200 ng de competidor o anticuerpo*

*Incubar las muestras con anticuerpo "over nighth" a 4°C

Análisis en gel

1. Preparar un gel de poliacrilamida al 4 % (29:1, acrilamida:bisacrilamida) en TBE 0.5X
2. Dejar polimerizar de 30 a 40 min.
3. Precorrer el gel en TBE 0.5X a 150 V por 1 hora a 4°C
4. Cargar la muestra y correr 3 h a 4°C
5. Colocar el gel en papel filtro y cubrir con egapack.

6. Secar en el secador de geles y exponer en film o casete para radioactividad.

Transfección estable

1. Linealizar el plásmido *pcDNA-HA-E2F6* con la enzima de restricción² Xho I (BioLabs)
Incubar toda la noche a 37°C

Xho I stock 20 000 U/mL (20 U/μL)					
DNA 1μg/μL	Buffer 2	BSA ³	Xho I	H ₂ O	V _{final}
20 μL	4 μL	0.4 μL	1 μL	14.6 μL	40 μL

2. Para purificar el plásmido linealizado, resolverlo en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio, aplicar 100 volts. Cargar 6 μL de Lambda (pm)
3. Recortar la banda correspondiente al plásmido procurando que sea lo más delgada posible.
4. Extraer el plásmido del gel con el kit "QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol"
5. Transfetar de 1 a 5 μg del plásmido linealizado con lipofectamina en placas de 6 pozos.
Sembrar 300 000 células HeLa.
6. Mantener durante 2 semanas en selección con Geneticina 0.9 mg/mL
7. Mantener en cultivo con Geneticina

² La enzima para linealizar se elige de tal forma que no se corte el gen de resistencia a neomicina, el promotor y el DNA de interés

³ BSA concentración inicial (10 μg/ μL) 10 000 μg/mL debe quedar 100 μg/mL

Western blot

Preparación de proteína

1.- Preparar el buffer RIPA modificado y añadirle antes de usar lo siguientes inhibidores de proteasas a una concentración final 1X Aprotinina, Leupeptina y Pepstatina

RIPA Bufer: (Maniatis)

50mM Tris-Cl (ph 7.5)

150mM NaCl

1% NP-40

0.5% Deoxicolato de sodio

0.1% SDS

1. Tomar 10×10^6 células y lizarlas con 100 μ l de bufer RIPA frío
2. Incubar en hielo 15 min
3. Centrifugar 5 min a max vel y transferir el sobrenadante a un tubo limpio. Tomar 1 alícuota para cuantificar proteína
4. Alicuotar en dos eppendorffs (50 μ l c/u)
5. Congelar a -70°C (hasta 3 días)

Cuantificación de proteínas.

Utilizar una placa de ELISA.

Diluir el Bradford 1:5 en agua desionizada. (Bradford=Bio-Rad protein assay Dye reagent concentrate)

Colocar 200 μ l de Bradford diluido en los pozos a utilizar

Hacer una curva estándar por duplicado con BSA de 0, 1.25, 2.5, 5, 10 y 20 μ g / μ l

Medir la absorbancia en el espectrofotómetro para ELISA con el filtro 4 para 560nm.

Interpolar en la curva los valores de las muestras para obtener su concentración

Electroforesis

4.- Armar los vidrios con los separadores

5.- Preparar el gel de acrilamida.

5.1 Primero es el gel resolving y se prepara como sigue y dependiendo del peso de la proteína, por ejemplo para GATA-1 se necesita al 12% y para CTCF al 10% (Ver tabla):

A un vaso de precipitado de 50ml pipetear los reactivos en el siguiente orden:
H₂O, Resolving buffer, acrilamida 40%, SDS 10%, PSA 10%, TEMED.

5.2 Colocar inmediatamente con jeringa de 10ml hasta la marca verde del presionador y sin hacer burbujas.

5.3 Colocar metanol sobre el resolving buffer suavemente para evitar que mezcle.

5.4 Esperar 30min hasta que polimerise.

5.5 Quitar el metanol y escurrir sobre una sanita. Lavar con agua bidestilada.

5.6 Preparar la acrilamida 3% (Stacking) en el siguiente orden:

H₂O, Space buffer, Acrilamida 40%, SDS 10%, PSA 10%, TEMED.

Colocar con jeringa sobre el gel anterior hasta el tope de los vidrios y colocar inmediatamente el peine.

5.7 Dejar polimerizar 30 min.

	3% (stacking)	7.5%	10%	12%
Resolving Buffer	-----	1.25 ml	1.25ml	1.25ml
Spacer buffer	1.25ml	-----	-----	-----
Acrilamida(40%)	0.75ml	1.875ml	2.5ml	3ml
SDS (10%)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Agua	7.8ml	6.67ml	6.04ml	5.54ml
PSA(10%)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

6. Utilizar entre 30 y 40µg de proteína en un volumen no mayor a 30µl

7. A cada muestra se le añade 5µl de buffer de carga y 1µl de DTT ajustar a 30µl volumen final.

Para preparar 1M de DTT se disuelven 3.09g de DTT en 20 ml de acetato de sodio .01M (pH 5.2). Esterilizar y alicuotar.

8.- Calentar la muestra a 100°C durante 5 min y de ahí incubar en hielo rápidamente.

9.- Pasar a la cámara de electrodo (Bio-Rad) y llenar la cámara con buffer de electroforesis (Ver anexo).

10.- Cargar las muestras que se prepararon en los pasos 4 a 6.

10.1.- Cargar en el primer carril y en el último agua + loading buffer, en el segundo el marcador de peso molecular (Marcador de peso molecular Protein ladder). Se añade 8 µl + 2 µl de loading buffer sin DTT. En el primer y en el último pozo y entre eso las muestras

10.3.- Rellenar los espacios vacíos con 5 µl de buffer de cargado.

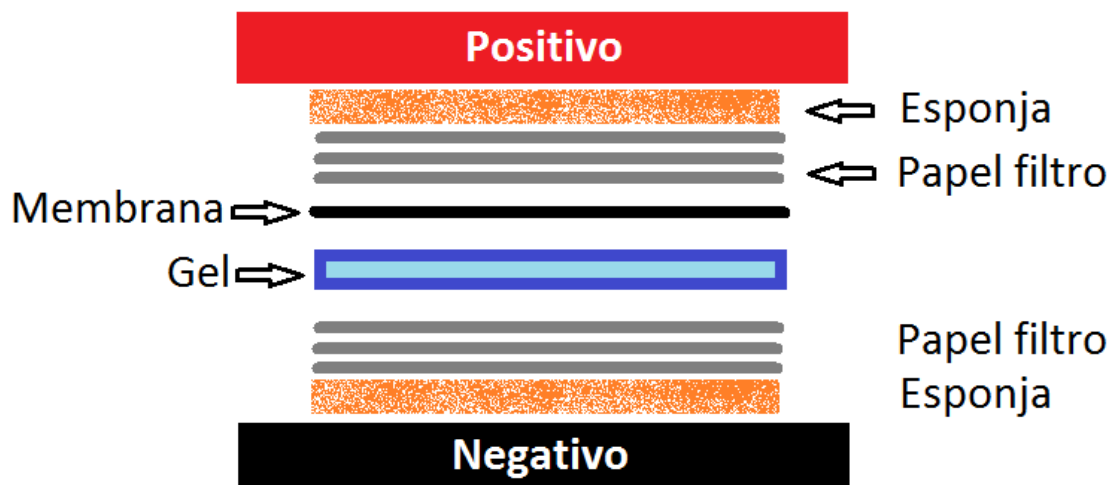
12.- Pre-correr las proteínas corriendo por aprox 10 min a 100V

13.- Correr la muestra por 30 min a 200 V o dependiendo de la proteína de interés.

Para la transferencia de proteínas se hace lo siguiente:

14.- Cortar la membrana PVDF (Millipore) al tamaño del gel y ponerla a remojar en metanol por 1 minuto esto para volver hidrofílica a la membrana. Enjuagar en agua. Colocarla en el buffer de transferencia (ver anexo) por lo menos 15 min. a 4 °C antes de usarla.

15.- Para armar el sándwich se hace lo siguiente todo en un recipiente de plástico con buffer de transferencia:



16.- Se coloca en aparato de transferencia para los cassettes con la parte negra hacia la parte negra del aparato.

- 16.1 Se le coloca una mosca, y se llena de buffer de transferencia y se pone la placa de hielo
 - 16.2 Se pone sobre un recipiente de plástico y después se llena de hielo alrededor, monitorear para que siempre esté con hielo. Esto se coloca sobre una plancha magnética
 - 17.- Se transfiere a 500mA por 2 horas. Si es overnight no se necesita hielo ni placa magnética. Se deja a 75-90 mA.
 - 18.- Desmontar el sándwich con mucho cuidado. Lavar la membrana con TBS pH 7.5
 - 19.- Se pone buffer de bloqueo (ver anexo) en un recipiente pequeño donde quepa la membrana
 - 20.- Colocar la membrana con la cara que estaba en contacto con el gel hacia arriba y se satura de buffer de bloqueo se deja en agitación por 2 horas a °RT. Escurrir
 - 21.- En buffer de bloqueo, añadir el anticuerpo primario a la dilución requerida.
 - 22.- Incubar ON a 4°C
 - 23.- Desechar el buffer y lavar 5 veces por 5 min con TBS-Tween 0.1%. Esto en agitación
 - 24.- Adicionar 10 ml de buffer de bloqueo
 - 25.- Añadir el anticuerpo secundario con la dilución requerida
 - 26.- Incubar en agitación durante 1 hora a °RT.
 - 27.- Lavar 5x5 min con TBS-Tween
 - 28.- Enjuagar con TBS sólo por 5 min.
 - 29.- Preparar la solución de revelado añadiendo 3 ml (1 a 2ml es suficiente) de cada reactivo (Super signal) Se pone la membrana con el sustrato por 5 minutos
 - 30.- Enjuagar con TBS sólo.
 - 31.- Envolver la membrana con eggapack y ponerla dentro de un cassette sobre esta poner un film.
 - 30.- Revelar después de 1 minuto.
- DESNUDAR LA MEMBRANA
- Sumergir la membrana en Stripping buffer por 30 min a 50 °C
- Lavar la membrana 2 veces con TBS sin Tween
- Bloquear.

SOLUCIONES

Buffer de Transferencia

192mM Glicina

25mM Tris-HCl

20% Metanol

Buffer de Corrida

Tris-HCl 250mM

Glicina

SDS 10%

Buffer de bloqueo

5% leche en polvo descremada

1% BSA

TBS 1X

Buffer TBS

NaCl 150mM

Tris 15mM, pH 7.5

1.560 tris-HCl pH 6-8.5 1M

5ml SDS 10%

Stripping buffer

(25ml)

1.560 tris-HCl pH 6-8.5 1M

5ml SDS 10%

175 μ l B-Mercapto

H₂O a 25ml

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiló F, Zhou MM, Walsh MJ. Long Noncoding RNA, Polycomb, and the Ghosts Haunting INK4b-ARF-INK4a Expression. *Cancer Res.* 2011;71:5365-5369.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P. *Molecular Biology of the Cell.* Garland Publishing Inc, New York and London.2002.
- Alder O, Laval F, Helness A, Brookes E, Pinho S, Chandrashekar A, Arnaud P, Pombo A, O'Neill L, Azuara V. Ring1B and Suv39h1 delineate distinct chromatin states at bivalent genes during early mouse lineage commitment. *Development.* 2010;137:2483-2492.
- Attwooll C, *et al.* A novel repressive E2F6 complex containing the polycomb group protein, EPC1, that interacts with EZH2 in a proliferation-specific manner. *J. Biol. Chem.* 2005;280:1199-1208.
-
- Balatti V, Maniero S, Ferracin M, Veronese A, Negrini M, Ferrocci G, Martini F, Tognon MG. MicroRNAs dysregulation in human malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2011;6:844-851.
- Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer.* 2006;6:107-116.
-
- Becker PB, Hörz W. ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:247-273.
- Berezikov, E., Thuemmler, F., van Laake, L.W., Kondova, I., Bontrop, R. Cuppen, E. and Plasterk, R.H. Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain. *Nat. Genet.* 2006;38:1375–1377.
- Bergers G, Hanahan D, Coussens LM. Angiogenesis and apoptosis are cellular parameters of neoplastic progression in transgenic mouse models of tumorigenesis. *Int J Dev Biol.* 1998;42:995-1002.
- Bernstein E, Allis CD: RNA meets chromatin. *Genes Dev.* 2005;19:1635-1655.
- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. A bivalent

chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*. 2006;125:315-326.

- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002;16:6–21.
- Blomen VA, Boonstra J. Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68:27-44.
- Bogdanović O, Veenstra GJ. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*. 2009;118:549-565.
- Bolzer A., Kreth G., Solovei I., Koehler D., Saracoglu K., Fauth C., Muller S., Eils R., Cremer C., Speicher M.R., Cremer T. Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol*. 2005;3:826–842.
- Bonasio R, Lecona E, Reinberg D. MBT domain proteins in development and disease. *Semin Cell Dev Biol*. 2010;21:221-230.
- Bouazoune K, Mitterweger A, Langst G, Imhof A, Akhtar A, Becker PB, Brehm A: The dMi-2 chromodomains are DNA binding modules important for ATP-dependent nucleosome mobilization. *Embo J*. 2002;21:2430-2440.
- Bracken AP, Dietrich N, Pasini D, Hansen KH, Helin K. Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev*. 2006;20:1123-1136.
- Branco MR, Pombo A. Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *PLoS Biol*. 2006;4:e138.
- Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature*. 1998;391:597-601.
- Brower V. Epigenetics: Unravelling the cancer code. *Nature*. 2011;471:S12-S13.
- Buchwald G, van der Stoop P, Weichenrieder O, Perrakis A, van Lohuizen M, Sixma TK. Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of polycomb proteins Bmi1 and Ring1b. *EMBO J*. 2006;25:2465-2474.
- Bultman SJ, Herschkowitz JI, Godfrey V, et al. Characterization of mammary tumors from Brg1 heterozygous mice. *Oncogene*. 2008;27:460-468.

- Cao, R., *et al.* Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science*. 2002;298:1039-1043.
- Cao R, Zhang Y. The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev*. 2004;14:155-164.
- Chen H, Tu SW, Hsieh JT. Down-regulation of human DAB2IP gene expression mediated by polycomb Ezh2 complex and histone deacetylase in prostate cancer. *J. Biol. Chem*. 2005;280:22437-22444.
- Classon M, Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:910-917.
- Clemson CM, Hutchinson JN, Sara SA, Ensminger AW, Fox AH, Chess A, Lawrence JB. An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Mol Cell*. 2009;33:717-726.
- Cowin PA, Anglesio M, Etemadmoghadam D, Bowtell DD. Profiling the cancer genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2010;11:133-159.
- Cremer T, Cremer C. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat Rev Genet*. 2001;2:292-301.
- Cremer M., Ku K., Wagler B., Wizelman L., von Hase J., Weiland Y., Kreja L., Diebold J., Speicher M.R., Cremer T. Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J. Cell Biol*. 2003;5:809–820.
- Creyghton MP, Markoulaki S, Levine SS, Hanna J, Lodato MA, Sha K, Young RA, Jaenisch R, Boyer LA. H2AZ is enriched at polycomb complex target genes in ES cells and is necessary for lineage commitment. *Cell*. 2008;135:649-661.
- Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*. 2008;358:502-511.
- Croft J.A., Bridger J.M., Boyle S., Perry P., Teague P., Bickmore W.A. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J. Cell Biol*. 1999;145:1119–1131.
- de Bie P, Zaaroor-Regev D, Ciechanover A. Regulation of the Polycomb protein RING1B ubiquitination by USP7. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;400:389-395.
- De La Rosa-Velázquez IA, Rincón-Arano H, Benítez-Bribiesca L, Recillas-Targa F. Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. *Cancer Res*. 2007;67:2577-2585.

- de Napoles M, Mermoud JE, Wakao R, Tang YA, Endoh M, Appanah R, Nesterova TB, Silva J, Otte AP, Vidal M, Koseki H, Brockdorff N. Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell*. 2004;7:663-676.
- Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*. 2011;25:1010-1022.
- Delgado- Olgún P, Recillas-Targa F. Chromatin structure of pluripotent stem cells and induced pluripotent stem cells. *Brief Funct Genomics*. 2011;10:37-49.
- Dimri GP, Martinez JL, Jacobs JJ, Keblusek P, Itahana K, Van Lohuizen M, Campisi J, Wazer DE, Band V. The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 2002;62:4736-4745.
- Dinger ME, Amaral PP, Mercer TR, Pang KC, Bruce SJ, Gardiner BB, Askarian-Amiri ME, Ru K, Soldà G, Simons C, Sunkin SM, Crowe ML, Grimmond SM, Perkins AC, Mattick JS. Long noncoding RNAs in mouse embryonic stem cell pluripotency and differentiation. *Genome Res*. 2008;18:1433-1445.
- Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M, Fuks F, Lo Coco F, Kouzarides T, Nervi C, Minucci S, Pelicci PG. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science*. 2002;295:1079-1082.
- Dirscherl SS, Krebs JE: Functional diversity of ISWI complexes. *Biochem Cell Biol*. 2004;82:482-489.
- Drost J, Mantovani F, Tocco F, *et al*. BRD7 is a candidate tumour suppressor gene required for p53 function. *Nat Cell Biol*. 2010;12:380-389.
- Dunaief JL, Strober BE, Guha S, *et al*. The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell*. 1994;79:119-130.
- Ebisuya M, Yamamoto T, Nakajima M, Nishida E. Ripples from neighbouring transcription. *Nat Cell Biol*. 2008;10:1106-1113.
- Ellis L, Atadja PW, Johnstone RW. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol Cancer Ther*. 2009;8:1409-1420.
- Esteller M. DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations. *Curr Opin Oncol*. 2005;17:55-60.
- Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008;358:1148-59.

- Fabian, M.R., Sonenberg, N. and Filipowicz, W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 2010;79:351–379.
- Feinberg AP. The epigenetics of cancer etiology. *Semin Cancer Biol.* 2004;14:427-432.
- Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet.* 2006;7:21-33.
- Filion GJ, Zhenilo S, Salozhin S, Yamada D, Prokhortchouk E, Defossez PA. A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol Cell Biol.* 2006;26:169-181.
-
- Flemington EK, Speck SH, Kaelin WG Jr. E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:6914-6918.
- Folle GA. Nuclear architecture, chromosome domains and genetic damage. *Mutat Res.* 2008;658:172-183.
- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G *et al.* Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet.* 2005; 37:391–400.
- Frolov MV, Huen DS, Stevaux O, Dimova D, Balczarek-Strang K, Elsdon M, Dyson NJ. Functional antagonism between E2F family members. *Genes Dev.* 2001;15:2146-2160.
- Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 2003a;31:2305-2312.
- Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem.* 2003b;278:4035–4040.
- Füllgrabe J, Kavanagh E, Joseph B. Histone onco-modifications. *Oncogene.* 2011;30:3391-3403.
- Gearhart MD, Corcoran, CM, Wamstad JA, Bardwell VJ. Polycomb group and SCF ubiquitin ligases are found in a novel BCOR complex that is recruited to BCL6 targets. *Mol. Cell. Biol.* 2006;26:6880-6889.

- Grewal SI, Elgin SC. Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2002;12:178-187.
- Guasconi V, Ait-Si-Ali S. Chromatin dynamics and cancer. *Cancer Biol Ther*. 2004;3:825-830.
- Guil S, Esteller M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: Tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41:87–95.
- Gunawardena RW, Fox SR, Siddiqui H, Knudsen ES. SWI/SNF activity is required for the repression of deoxyribonucleotide triphosphate metabolic enzymes via the recruitment of mSin3B. *J Biol Chem*. 2007;282:20116-20123.
- Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, Tsai MC, Hung T, Argani P, Rinn JL, Wang Y, Brzoska P, Kong B, Li R, West RB, van de Vijver MJ, Sukumar S, Chang HY. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*. 2010;464:1071-1076.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
- Harbour JW, Dean DC. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev*. 2000;14:2393-2409.
- Hargreaves DC, Crabtree GR. ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res*. 2011;21:396-420.
- Harikrishnan KN, Chow MZ, Baker EK, Pal S, Bassal S, Brasacchio D, Wang L, Craig JM, Jones PL, Sif S, El-Osta A. Brahma links the SWI/SNF chromatin-remodeling complex with MeCP2-dependent transcriptional silencing. *Nat Genet*. 2005;37:254–264.
- Harrison BR, Yazgan O, Krebs JE. Life without RNAi: noncoding RNAs and their functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Cell Biol*. 2009;87:767-779.
- Helin K, Ed H. The retinoblastoma protein as a transcriptional repressor. *Trends Cell Biol*. 1993;3:43-46.
- Heimberg, A.M., Sempere, L.F., Moy, V.N., Donoghue, P.C. and Peterson, K.J. MicroRNAs and the advent of vertebrate morphological complexity. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2008;105:2946–2950.
- Heitz E. Das heterochromatin der Moose. *Jehrb Wiss Botanik* 1928;69;762–818.

- Hekimoglu B, Ringrose L Non-coding RNAs in polycomb/trithorax regulation.. RNA Biol. 2009;6:129-137.
- Hertel, J., Lindemeyer, M., Missal, K., Fried, C., Tanzer, A., Flamm, C., Hofacker, I.L. and Stadler, P.F. The expansion of the metazoan microRNA repertoire. BMC Genomics 2006;7:25.
- Honig A, Weidler C, Häusler S, Krockenberger M, Buchholz S, Köster F, Segerer SE, Dietl J, Engel JB. Overexpression of polycomb protein BMI-1 in human specimens of breast, ovarian, endometrial and cervical cancer. Anticancer Res. 2010;30:1559-1564.
- Horn PJ, Peterson CL: The bromodomain: a regulator of ATPdependent chromatin remodeling? Front Biosci. 2001;6:D1019-D1023.
- Hu K, Nan X, Bird A, Wang W. Testing for association between MeCP2 and the brahma-associated SWI/SNF chromatinremodeling complex. Nat Genet. 2006;38:962–964.
- Hung T, Chang HY. Long noncoding RNA in genome regulation: prospects and mechanisms. RNA Biol. 2010;7(5):582-585.
- Iborra F.J., Jackson D.A., and Cook P.R. Coupled transcription and translation within nuclei of mammalian cells. Science. 2001;293:1139–1142.
- Inoue Y, Kitagawa M, Taya Y. Phosphorylation of pRB at Ser612 by Chk1/2 leads to a complex between pRB and E2F-1 after DNA damage. EMBO J. 2007;26:2083-2093.
- 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, Feinberg AP. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. Nat Genet. 2009;41:178-186.
- Ivanovska I, Ball AS, Diaz RL, *et al.* MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression. Mol Cell Biol. 2008;28:2167-2174.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. Cancer J Clin. 2011;61:69-90.
- Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. Science. 2001;293:1074–1080.
- Johnson CN, Adkins NL, Georgel P: Chromatin remodeling complexes: ATP-dependent machines in action. Biochem Cell Biol. 2005, 83:405-417.
- Johnston AJ, Matveeva E, Kirioukhova O, Grossniklaus U, Griessem W. A dynamic reciprocal RBR-PRC2 regulatory circuit controls Arabidopsis gametophyte development. Curr Biol. 2008;18:1680-1686.

- Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1:287–99.
- Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet.* 2002;3:415-428.
- Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell.* 2007;128:683–689.
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet.* 1998;19:187–191.
- Jones S, Wang TL, Shih IeM, *et al.* Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science.* 2010;330:228-231.
- Jorgensen HF, Ben-Porath I, Bird AP. Mbd1 is recruited to both methylated and nonmethylated CpGs via distinct DNA binding domains. *Mol Cell Biol.* 2004;24:3387–3395.
- Jothi R, Cuddapah S, Barski A, Cui K, Zhao K. Genome-wide identification of in vivo protein-DNA binding sites from ChIP-Seq data. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:5221-5231.
- Kaneko S, Li G, Son J, Xu CF, Margueron R, Neubert TA, Reinberg D. Phosphorylation of the PRC2 component Ezh2 is cell cycle-regulated and up-regulates its binding to ncRNA. *Genes Dev.* 2010;24:2615-2620.
- Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix DA, Dutttagupta R, Willingham AT, Stadler PF, Hertel J, Hackermüller J, Hofacker IL, Bell I, Cheung E, Drenkow J, Dumais E, Patel S, Helt G, Ganesh M, Ghosh S, Piccolboni A, Sementchenko V, Tammana H, Gingeras TR. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science.* 2007;316(5830):1484-1488.
- Kavi HH, Fernandez HR, Xie W, Birchler JA: RNA silencing in *Drosophila*. *FEBS Lett.* 2005;579:5940-5949.
- Khaitan D, Dinger ME, Mazar J, Crawford J, Smith MA, Mattick JS, Perera RJ. The melanoma-upregulated long noncoding RNA SPRY4-IT1 modulates apoptosis and invasion. *Cancer Res.* 2011;71:3852-3862.
- Klein C, Busson P, Tursz T, Young LS, Raab-Traub N. Expression of the c-fgr related transcripts in Epstein-Barr virus-associated malignancies. *Int J Cancer.* 1988;42:29-35.
- Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci.* 2006;31:89-97.

- Knudson, A. G. Jr. Retinoblastoma: a prototypic hereditary neoplasm. *Semin Oncol.* 1978;5:57–60.
- Kotake, Y., Nakagawa, T., Kitagawa, K., Suzuki, S., Liu, N., Kitagawa, M. and Xiong, Y. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene* 2011;30:1956–1962.
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007;128:693–705.
- Ku M, Koche RP, Rheinbay E, Mendenhall EM, Endoh M, Mikkelsen TS, Presser A, Nusbaum C, Xie X, Chi AS, Adli M, Kasif S, Ptaszek LM, Cowan CA, Lander ES, Koseki H, Bernstein BE. Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet.* 2008;4:e1000242.
- Kumaran RI, Thakar R, Spector DL. Chromatin dynamics and gene positioning. *Cell.* 2008;132:929-934.
- Kuzmichev A, Nishioka K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev.* 2002;16:2893-2905.
- Lagarou A, Mohd-Sarip A, Moshkin YM, Chalkley GE, Bezstarosti K, Demmers JA, Verrijzer CP. dKDM2 couples histone H2A ubiquitylation to histone H3 demethylation during Polycomb group silencing. *Genes Dev.* 2008;22:2799-2810.
- Lanctôt C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet.* 2007;8:104-115.
- Ledl A, Schmidt D, Müller S. Viral oncoproteins E1A and E7 and cellular LxCxE proteins repress SUMO modification of the retinoblastoma tumor suppressor. *Oncogene.* 2005;24:3810-3818.
- Lee CW, Sørensen TS, Shikama N, La Thangue NB. Functional interplay between p53 and E2F through co-activator p300. *Oncogene.* 1998;16:2695-2710.
- Lee, W. H. et al. Human retinoblastoma susceptibility gene:cloning, identification, and sequence. *Science.* 1987;235:1394–1399.
- Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell.* 1992;71:865-873.
- Litovchick L, Sadasivam S, Florens L, Zhu X, Swanson SK, Velmurugan S, Chen R, Washburn MP, Liu XS, DeCaprio JA. Evolutionarily conserved multisubunit RBL2/p130 and

E2F4 protein complex represses human cell cycle-dependent genes in quiescence. *Mol Cell*. 2007;26:539-551.

-
- Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, Laird PW, Jones PA. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol*. 2002;22:480-491.
- Liu Y, Oakeley EJ, Sun L, Jost JP. Multiple domains are involved in the targeting of the mouse DNA methyltransferase to the DNA replication foci. *Nucleic Acids Res*. 1998;26:1038-1045.
- Longworth MS, Dyson NJ. pRb, a local chromatin organizer with global possibilities. *Chromosoma*. 2009;28.
- Lobanenko VV, Nicolas RH, Adler VV, Paterson H, Klenova EM, Polotskaja AV, Goodwin GH. A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene. *Oncogene*. 1990;5:1743-1753.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997;389:251–260.
- Lund AH, van Lohuizen M. Polycomb complexes and silencing mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16:239-246.
- Maeda RK, Karch F. The ABC of the BX-C: the bithorax complex explained. *Development*. 2006;133:1413-1422.
- Mahmoudi S, Henriksson S, Corcoran M, Méndez-Vidal C, Wiman KG, Farnebo M. Wrap53, a natural p53 antisense transcript required for p53 induction upon DNA damage. *Mol Cell*. 2009;33:462-471.
- Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature*. 2011;469:343-349.
- Martinez AM, Cavalli G. The role of polycomb group proteins in cell cycle regulation during development. *Cell Cycle*. 2006;5:1189-1197.
- Martinez NJ, Walhout AJ. The interplay between transcription factors and microRNAs in genome-scale regulatory networks. *Bioessays*. 2009;31:435–445.
- Masciullo V, Khalili K, Giordano A. The Rb family of cell cycle regulatory factors: clinical implications. *Int J Oncol*. 2000;17:897-902.

- Mattick JS. The central role of RNA in human development and cognition. *FEBS Lett.* 2011;585:1600-1616.
- Mattick JS, Amaral PP, Dinger ME, Mercer TR, Mehler MF. RNA regulation of epigenetic processes. *Bioessays.* 2009;31:51–59.
- Mattick JS, Makunin IV: Non-coding RNA. *Hum Mol Genet* 2006;1:R17-R29.
- Melo SA, Esteller M. Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire. *FEBS Lett.* 2011;585:2087-2099.
- Mercer, T.R., Dinger, M.E. and Mattick, J.S. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat. Rev. Genet.* 2009;10:155–159.
- Miranda TB, Jones PA. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol.* 2007;213:384-390.
- Monier R. Oncogenes and anti-oncogenes in tumorigenesis. *Reprod Nutr Dev.* 1990;30:445-454.
- Morris EJ, Dyson NJ. Retinoblastoma protein partners. *Adv Cancer Res.* 2001;82:1-54.
- Müller J, Verrijzer P. Biochemical mechanisms of gene regulation by polycomb group protein complexes. *Curr Opin Genet Dev.* 2009;19:150-158.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpGbinding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature.* 1998;393:386–389.
- Narita M, Nunez S, Heard E, Narita M, Lin AW, Hearn SA, Spector DL, Hannon GJ, Lowe SW. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* 2003;113:703-716.
- Neal CS, Michael MZ, Rawlings LH, Van der Hoek MB, Gleadow JM. The VHL-dependent regulation of microRNAs in renal cancer. *BMC Med.* 2010;8:64.
- Nekrasov M, Wild B, Müller J. Nucleosome binding and histone methyltransferase activity of Drosophila PRC2. *EMBO Rep.* 2005;6:348-353.
- Nguyen DX, Baglia LA, Huang SM, Baker CM, McCance DJ. Acetylation regulates the differentiation-specific functions of the retinoblastoma protein. *EMBO J.* 2004;23:1609-1618.

- Oberley MJ, Inman DR, Farnham PJ. E2F6 negatively regulates BRCA1 in human cancer cells without methylation of histone H3 on lysine 9. *J. Biol. Chem.* 2003;278:42466-42476.
- Ogawa H, Ishiguro K, Gaubatz S, Livingston DM, Nakatani Y. A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science.* 2002;296:1132-1136.
- Ohm JE, Baylin SB. Stem cell chromatin patterns: an instructive mechanism for DNA hypermethylation? *Cell Cycle.* 2007;6:1040-1043.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 1999;99:247-257.
- Ohlsson R, Renkawitz R, Lobanenkov V. CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet.* 2001;17:520-527.
- Ohlsson R, Lobanenkov V, Klenova E. Does CTCF mediate between nuclear organization and gene expression? *Bioessays.* 2010;32:37-50.
- Pheasant M, Mattick JS. Raising the estimate of functional human sequences. *Genome Res.* 2007;17:1245-1253.
- Phillips JE, Corces VG. CTCF: master weaver of the genome. *Cell.* 2009;137:1194-1211.
- Pien S, Grossniklaus U. Polycomb group and trithorax group proteins in Arabidopsis. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1769:375-382.
- Pimentel E. Oncogenes and human cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 1985;14:347-368.
- Pollard KS, Salama SR, Lambert N, Lambot MA, Coppens S, Pedersen JS, Katzman S, King B, Onodera C, Siepel A, Kern AD, Dehay C, Igel H, Ares M Jr, Vanderhaeghen P, Haussler D. An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly in humans. *Nature.* 2006;443:167-172.
- Prasanth KV, Spector DL. Eukaryotic regulatory RNAs: an answer to the 'genome complexity' conundrum. *Genes Dev.* 2007;21:11-42.
- Recillas-Targa F, De La Rosa-Velázquez IA, Soto-Reyes E, Benítez-Bribiesca L. Epigenetic boundaries of tumour suppressor gene promoters: the CTCF connection and its role in carcinogenesis. *J Cell Mol Med.* 2006;10:554-568.

- Reid G, Gallais R, Metivier R. Marking time: The dynamic role of chromatin and covalent modification in transcription. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41:155–63.
- Reisman D, Glaros S, Thompson EA. The SWI/SNF complex and cancer. *Oncogene.* 2009;28:1653-1668.
- Riggs AD, Jones PA. 5-methylcytosine, gene regulation, and cancer. *Adv Cancer Res.* 1983;40:1-30.
- Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Bruggmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E, Chang HY. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell.* 2007;129:1311-1323.
- Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet.* 2005;6:597-610.
- Rubin SM, Gall AL, Zheng N, Pavletich NP. Structure of the Rb C-terminal domain bound to E2F1-DP1: a mechanism for phosphorylation-induced E2F release. *Cell.* 2005;123:1093-1106.
- Ruthenburg AJ, Li H, Patel DJ, Allis CD. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:983-994.
- Saddic LA, West LE, Aslanian A, Yates JR 3rd, Rubin SM, Gozani O, Sage J. Methylation of the retinoblastoma tumor suppressor by SMYD2. *J Biol Chem.* 2010;285:37733-37740.
- Saladi SV, de la Serna IL. ATP dependent chromatin remodeling enzymes in embryonic stem cells. *Stem Cell Rev.* 2010;6:62-73.
- Sánchez C., *et al.* Proteomics analysis of Ring1B/Rnf2 interactors identifies a novel complex with the Fbxl10/Jhdm1B histone demethylase and the Bcl6 interacting corepressor. *Mol. Cell. Proteomics.* 2007;6:820-834.
- Sansom OJ, Maddison K, Clarke AR. Mechanisms of disease: methyl-binding domain proteins as potential therapeutic targets in cancer. *Nat Clin Pract Oncol.* 2007;4:305-315.
- Sarma K, Reinberg D. Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6:139-149.
- Sasaki YT, Hirose T. How to build a paraspeckle. *Genome Biol.* 2009;10:227.
- Scambia G, Lovergine S, Masciullo V. RB family members as predictive and prognostic factors in human cancer. *Oncogene.* 2006;25:5302-5308.

- Schoeftner S, Sengupta AK, Kubicek S, Mechtler K, Spahn L, Koseki H, Jenuwein T, Wutz A. Recruitment of PRC1 function at the initiation of X inactivation independent of PRC2 and silencing. *EMBO J.* 2006;25:3110-3122.
- Schwartz YB, Kahn TG, Nix DA, Li XY, Bourgon R, Biggin M, Pirrotta V. Genome-wide analysis of Polycomb targets in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet.* 2006;38:700-705.
- Schwartz YB, Pirrotta V. Polycomb complexes and epigenetic states. *Curr Opin Cell Biol.* 2008;20:266-273.
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis.* 2010;31:27–36.
- Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell.* 2004;116:235-246.
- Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell.* 2002;2:103-112.
- Simon JA, Kingston RE. Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10:697-708.
- Sparmann A, van Lohuizen M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:846-856.
- Spector DL. The dynamics of chromosome organization and gene regulation, *Annu. Rev. Biochem.* 2003;72:573–608.
- Spitale RC, Tsai MC, Chang HY. RNA templating the epigenome: long noncoding RNAs as molecular scaffolds. *Epigenetics.* 2011;6:539-543.
- Storre J, Schäfer A, Reichert N, Barbero JL, Hauser S, Eilers M, Gaubatz S. Silencing of the meiotic genes SMC1beta and STAG3 in somatic cells by E2F6. *J Biol Chem.* 2005;280:41380-41386.
- Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000;403:41–45.
- Struhl K. Transcriptional noise and the fidelity of initiation by RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14:103-105.
- Sunwoo H, Dinger ME, Wilusz JE, Amaral PP, Mattick JS, Spector DL. MEN epsilon/beta nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles. *Genome Res.* 2009;19:347-359.

- Suvà ML, Riggi N, Janiszewska M, Radovanovic I, Provero P, Stehle JC, Baumer K, Le Bitoux MA, Marino D, Cironi L, Marquez VE, Clément V, Stamenkovic I. EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance. *Cancer Res.* 2009;69:9211-9218.
- Tanabe H., Habermann F.A., Solovei I., Cremer M., Cremer T. Non-random radial arrangements of interphase chromosome territories: evolutionary considerations and functional implications. *Mutat. Res.* 2002;504:37–45.
- Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:3740-3745.
- Thiagalingam S, Cheng KH, Lee HJ, Mineva N, Thiagalingam A, Ponte JF. Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;983:84–100.
- Tomilin NV. Regulation of mammalian gene expression by retroelements and non-coding tandem repeats. *Bioessays.* 2008;30:338–348.
- Trimarchi JM, Fairchild B, Wen J, Lees JA. The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:1519-1524.
- Trimarchi JM, Lees JA. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2002;3:11-20.
- Tsai HC, Baylin SB. Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine. *Cell Res.* 2011;21:502-517.
- Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA, Chinnaiyan AM. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature.* 2002;419:624-629.
- Versteeg I, Medjkane S, Rouillard D, Delattre O. A key role of the hSNF5/INI1 tumour suppressor in the control of the G1-S transition of the cell cycle. *Oncogene.* 2002;21:6403-6412.
- Versteeg I, Sévenet N, Lange J, Rousseau-Merck MF, Ambros P, Handgretinger R, Aurias A, Delattre O. Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature.* 1998;394:203-206.

- Vincenz C, Kerppola TK. Different polycomb group CBX family proteins associate with distinct regions of chromatin using nonhomologous protein sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:16572-16577.
- Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 2004;10:789-799.
- Wang GG, Allis CD, Chi P. Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications. *Trends Mol Med*. 2007;13:363-372.
- Wang X, Nagl NG Jr, Flowers S, et al. Expression of p270 (ARID1A), a component of human SWI/SNF complexes, in human tumors. *Int J Cancer*. 2004;112:636.
- Weinberg RA. Is metastasis predetermined? *Mol Oncol*. 2007;1:263-264.
- Weinberg, RA. Tumor suppressor genes. *Science*. 1991;254:1138-1146.
- Whitcomb SJ, Basu A, Allis CD, Bernstein E. Polycomb Group proteins: an evolutionary perspective. *Trends Genet*. 2007;23:494-502.
- Wilson BG, Wang X, Shen X, *et al*. Epigenetic antagonism between polycomb and SWI/SNF complexes during oncogenic transformation. *Cancer Cell*. 2010;18:316-328.
- Wilusz JE, Sunwoo H, Spector DL. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev*. 2009;23:1494-1504.
- Woo CJ, Kharchenko PV, Daheron L, Park PJ, Kingston RE. A region of the human HOXD cluster that confers polycomb-group responsiveness. *Cell*. 2010;140:99-110.
- Woods K, Thomson JM, Hammond SM. Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *J Biol Chem*. 2007;282:2130-2134.
- Wu HA, Bernstein E. Partners in imprinting: noncoding RNA and polycomb group proteins. *Dev Cell*. 2008;15:637-638.
- Wu JI, Lessard J, Crabtree GR. Understanding the words of chromatin regulation. *Cell*. 2009;136:200-206.
- Wyers F, Rougemaille M, Badis G, Rousselle JC, Dufour ME, Boulay J, Régnault B, Devaux F, Namane A, Séraphin B, Libri D, Jacquier A. Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. *Cell*. 2005;121:725-737.
- Xia W, Nagase S, Montia AG, et al. BAF180 is a critical regulator of p21 induction and a tumor suppressor mutated in breast cancer. *Cancer Res*. 2008;68:1667-1674.

- Xu J, Wang B, Xu Y, Sun L, Tian W, Shukla D, Barod R, Grillari J, Grillari-Voglauer R, Maxwell PH, Esteban MA. Epigenetic regulation of HIF-1 α in renal cancer cells involves HIF-1 α /2 α binding to a reverse hypoxia-response element. *Oncogene*. 2011
- Xu, X, *et al.* A comprehensive ChIP-chip analysis of E2F1, E2F4, and E2F6 in normal and tumor cells reveals interchangeable roles of E2F family members. *Genome Res*. 2007;**17**:1550-1561.
- Ying H, Xiao ZX. Targeting retinoblastoma protein for degradation by proteasomes. *Cell Cycle*. 2006;**5**:506-508.
- Yoon HG, Chan DW, Reynolds AB, Qin J, Wong J. N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. *Mol Cell*. 2003;**12**:723-734.
- Zaidi SK, Young DW, Choi JY, Pratap J, Javed A, Montecino M, Stein JL, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein GS. Intranuclear trafficking: organization and assembly of regulatory machinery for combinatorial biological control. *J. Biol. Chem*. 2004;**279**:43363–43366.
- Zhang HS, Gavin M, Dahiya A, *et al.* Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* 2000;**101**:79-89.
- Zhang XW, Zhang L, Qin W, Yao XH, Zheng LZ, Liu X, Li J, Guo WJ. Oncogenic role of the chromobox protein CBX7 in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;**29**:114.
-

7. APÉNDICES

7.1. Tabla de oligonucleótidos

Nombre	Secuencia 5'→3'	Función	T _m (°C)
Rbprom Fw	CCAGACTCTTTGTATAGCC	Amplifica el promotor del gen RB1	58
Rbprom Rev	TCCTCTCCCGACTCCCGTTA	Amplifica el promotor del gen RB1	58
Hec02R	ACCATGGTGGCGACC	Reverso sobre GFP para amplificar el transgen	56
Ex27Rb F1	GGTGAATCATTCGGGACTTCTG	Para RT-PCR sobre el exón 24-25	57.8
Ex27Rb F2	GGTATGTAACAGCGACCGTGTG	Para RT-PCR sobre el exón 25	57.6
Ex27Rb Rev	CTCTTCCTTGTTTGAGGTATCC	Para RT-PCR sobre el exón 27	57.6/57.8
RTRB-F	AAGTACCCATCTAGTACT	Control negativo de ChIP, sobre exón 27	51
RTRB-R	AAGTTACAGCATCTCTAAA	Control negativo de ChIP, sobre exón 27	51
E2F-Rb1	ACTTTTTCCCGCGGTTGGAC	Sonda para EMSA	
E2F-Rb2	GTCCAACCGCGGGAAAAAGT		

7.2. Tabla de plásmidos

Plásmido	Descripción
pERb	pEGFP-1 con el promotor del gen Rb en el sitio BamHI (Héctor Rincón)
pERbmutE	pEGFP-1 con el promotor del gen Rb en el sitio BamHI con el sitio CTCF mutado (Inti De La Rosa)
pcDNA-HA-E2F6	pcDNA 3.1 con el cDNA de E2F6 en sitio BamHI-EcoRI (Stefan Gaubatz)
pcDNA3-EZH2	pcDNA 3 con el cDNA de EZH2 en sitio BamHI-XhoI (Varambally)
pGLRb	pGL3 basic con el promotor del gen Rb en el sitio BamHI-BglII (Inti De La Rosa)
pcDNA-HYGRO	pcDNA con resistencia a Hygromicina

7.3. Tabla de anticuerpos

Anticuerpo	Marca
H3ac	Upstate
H4ac	
MeCP2	
KAISO	
actina	Donado por el Dr. Alejandro Zentella (Instituto nacional de Nutrición, Mexico DF, Mexico)
CTCF (N17)	Santa Cruz Biotechnology
MBD2 (N18)	
H3K9me3	Donado por el Dr. Thomas Jenuwein (Instituto de Inmunología Max Planck, Freiburg, Alemania)
H4K20me3	
H3K27me3	

7.4. Publicaciones

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Gain of DNA methylation is enhanced in the absence of CTCF at the human *retinoblastoma* gene promoter

Mercedes Dávalos-Salas, Mayra Furlan-Magaril, Edgar González-Buendía, Christian Valdes-Quezada, Erandi Ayala-Ortega and Félix Recillas-Targa*

Abstract

Background: Long-term gene silencing throughout cell division is generally achieved by DNA methylation and other epigenetic processes. Aberrant DNA methylation is now widely recognized to be associated with cancer and other human diseases. Here we addressed the contribution of the multifunctional nuclear factor CTCF to the epigenetic regulation of the human *retinoblastoma* (*Rb*) gene promoter in different tumoral cell lines.

Methods: To assess the DNA methylation status of the *Rb* promoter, genomic DNA from stably transfected human erythroleukemic K562 cells expressing a *GFP* reporter transgene was transformed with sodium bisulfite, and then PCR-amplified with modified primers and sequenced. Single- and multi-copy integrants with the CTCF binding site mutated were isolated and characterized by Southern blotting. Silenced transgenes were reactivated using 5-aza-2'-deoxycytidine and Trichostatin-A, and their expression was monitored by fluorescent cytometry. *Rb* gene expression and protein abundance were assessed by RT-PCR and Western blotting in three different glioma cell lines, and DNA methylation of the promoter region was determined by sodium bisulfite sequencing, together with CTCF dissociation and methyl-CpG-binding protein incorporation by chromatin immunoprecipitation assays.

Results: We found that the inability of CTCF to bind to the *Rb* promoter causes a dramatic loss of gene expression and a progressive gain of DNA methylation.

Conclusions: This study indicates that CTCF plays an important role in maintaining the *Rb* promoter in an optimal chromatin configuration. The absence of CTCF induces a rapid epigenetic silencing through a progressive gain of DNA methylation. Consequently, CTCF can now be seen as one of the epigenetic components that allows the proper configuration of tumor suppressor gene promoters. Its aberrant dissociation can then predispose key genes in cancer cells to acquire DNA methylation and epigenetic silencing.

Background

DNA methylation and histone post-translational modifications have been considered as the main processes involved in conferring plasticity to transcriptional programs, and for allowing the transmission of epigenetic traits, including those involved in certain diseases [1]. Aberrant DNA methylation remains a central component of tumor suppressor gene epigenetic silencing in cancer, but the causes of abnormal methylation remain unclear [2]. Potential clarification is emerging from

genome-wide surveys that determine different features of promoters known to contain CpG-islands, which are classified according to their high, intermediate and low CpG content [3,4]. Different degrees of DNA methylation cause diverse effects depending on the sub-class of CpG-island present. More recently, these studies have been complemented by a novel concept: the "CpG-island shores" [5]. A CpG-island shore refers to the way in which a CpG-island incorporates DNA methylation. Interestingly, this propagates from opposite ends, moving forward to the central region, which is frequently composed of the highest CpG dinucleotide density [5]. This evidence suggests that DNA methylation does not

* Correspondence: frecilla@ifc.unam.mx
Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Genética Molecular,
Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

initiate necessarily where the highest CpG density is located, but instead, the abnormal methylation starts from the “outside” towards the “inside” by unknown mechanisms over promoter regions. Additional consequences emerge from these observations: 1) It is difficult to define where DNA methylation begins at a specific CpG-island; and 2) It is probable, as anticipated, that a critical density of methylated CpGs are needed for the epigenetic silencing to occur.

Conversely, there is also evidence suggesting that promoter regions associated with tumor suppressor genes, corresponding to CpG-islands, are not necessarily silenced by DNA methylation [6]. Indeed, the genomic context and even larger genomic segments like “long range epigenetic silencing” (LRES) regions can negatively modify the chromatin structure of gene promoters within these regions that are linked to cancer [7]. In spite of all this evidence, the mechanisms of epigenetic silencing by DNA methylation are not completely understood.

We have previously analyzed the promoters of the human *retinoblastoma* (*Rb*) and *p53* tumor suppressor genes, where these promoters correspond to high CpG and low CpG islands, respectively [8,9]. We have found that the *Rb* promoter is mainly silenced by DNA methylation [8]. In contrast, the *p53* core promoter does not acquire DNA methylation, and instead, it shows the incorporation of the repressive histone mark H3K27me3 in glioblastoma cell lines [9]. In both cases, we demonstrated that the multifunctional nuclear factor CTCF seems to shield the promoters against epigenetic silencing. Interestingly, these results are not restricted to the *Rb* and *p53* genes, since similar observations have been reported for the human *BRCA1* and *p16^{INK4a}* genes [10-12].

With the aim of better understanding the mechanisms associated with *Rb* promoter epigenetic silencing, we analyzed its DNA methylation status in detail in different cell types [13-16]. We asked whether the absence of CTCF binding to the *Rb* promoter is able to contribute, firstly, to more rapid and extensive DNA methylation, and secondly, to faster and robust epigenetic silencing. Indeed, we found that the inability of CTCF to bind to its recognition motif at the human *Rb* promoter causes accelerated DNA methylation and epigenetic silencing in transgenes and in glioma cells. Our results demonstrate that CTCF is a key component of a sub-class of gene promoters, and that its deregulation may be one of the steps leading to cancer development.

Methods

Cell cultures

HeLa cells were cultured in DMEM medium; K562 cells were cultured in ISCOVE medium; human glioblastoma-astrocytoma U87MG and U373MG cells, neuroblastoma

SHSY-5Y cells, and human glioblastoma T98G cells were cultured in RPMI-1640 medium; all media contained 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin. Culture media were purchased from Invitrogen. Cells were maintained at 37°C in a humidified 5% CO₂-containing atmosphere.

Plasmids

The *Rb* promoter genomic DNA (positions 1634-2020, GenBank accession number L11910) was subcloned into the XhoI/HindIII sites of pGL3-Basic plasmid (Promega) to generate the pGLRb plasmid. The pERb and pERbmutE plasmids containing the GFP reporter gene under the control of the *Rb* wild-type and mutated promoters, respectively, were previously generated and described by De La Rosa-Velazquez *et al.*, 2007 [8]. The integrity of all plasmid constructs was verified by DNA sequencing.

Stable transfection of K562 cells and reactivation assay

Linearized pERb and pERbmutE were used to generate stable cell lines. After selection, neomycin-resistant clones were isolated and analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS). Clones were subsequently cultured in the absence of neomycin in medium for up to 23 weeks. The integrity of the transgene was tested by Southern blotting. For reactivation experiments, stable cell lines were treated for 3 days with 5-aza-2'-deoxycytidine (30 μmol/ml), Trichostatin-A (15 ng/ml), or both. After treatment, the cells were harvested in FACS flow (BD Science) and analyzed by FACS. The percentage of reactivated cells was plotted in the corresponding graph.

Sodium bisulfite treatment and methylation analysis

Bisulfite analysis was performed as described previously [9]. The PCR primers for stable cell lines were designed specifically against the plasmid sequences to avoid amplification of the endogenous promoter. Nested PCR was done with the EGFPbis1-EGFPbis2 primer pair, and the second round of PCR amplification was done with the EGFPbis3-EGFPbis4 primer pair. The product from the second PCR was gel-purified, and a third PCR was done with A3res-A4res primers specific for the *Rb* promoter (see below). PCR products were cloned in the pGEM-11zf vector (Promega) and sequenced using the T7 primer. Primers used were EGFPbis1: 5'-TTTGGT TTTTGTGGT TTTTGT-3' and EGFPbis2: 5'-AAATAAACCAAAACACCAACAAC-3'; EGFPbis3: 5'-CG GGATCCTTTTTTTTGTGTTATTTTTTG-3' and EGFPbis4: 5'-CGGGATCCAAATCAACT TACCCTAA ATAAC-3'; A3res: 5'-CGGGATCCTTAGGTTTTT-TAGTTTAATTTTTTATGA T-3'; A4res: 5'-CGGGATC CAACTATAAAAAACCCCAAAAAAAC-3'; GFPPrb-Fw: 5'-GGGATTTAGATTTTTTTGTATAGTT-3' and

GFPRb-Rev: 5'-CAAATAAACTTCAAAA TCAACT-TAC-3'.

Reagents and antibodies

The following antibodies were used in this study: acH3, acH4 antibodies, CTCF (N-17), MBD2 (N-18), MeCP2 (07-013) and Kaiso (clone 6F) from Millipore (Millipore); H3K27me3 antibody was kindly provided by Dr. Thomas Jenuwein (Max-Planck Institute of Immunobiology and Epigenetics, Freiburg, Germany). The rabbit anti-Rb (C-15) antibody (sc 12370) was purchased from Santa Cruz Biotechnology and horseradish peroxidase (HRP) linked to anti-rabbit immunoglobulin (81-6120) from Zymed. Mouse anti-human actin antibody was kindly provided by Dr. Alejandro Zentella Dehesa (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México).

Semiquantitative RT-PCR and Western blot analysis

For semiquantitative RT-PCR, total RNA was isolated using Trizol reagent from Invitrogen Corporation (GIBCO), and 5 µg RNA from each preparation was used as an RT template in a reverse transcription system (Promega). PCR was performed using the following specific primer pairs: Ex27RBF2: 5'-GGTATGTAACAGC-GACCGTGTG-3' and Ex27RBRev: 5'-CTCTTCCTTG TTTGAGGTATCC-3'; β-actin: 5'-CGTACCACTGG-CATCGTG-3' and 5'-GGTAGTCAGTC AGGTCCC-3'. Total protein concentration was determined using the commercial Bradford reagent assay (Bio-Rad). 10 µg of total protein was used for the detection of Rb. Samples were first boiled in sample buffer (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% v/w SDS, 10% v/v glycerol, 0.1% bromophenol blue, 2% v/v 2β-mercaptoethanol) for 5 min and resolved by 10% SDS-PAGE. The proteins were transferred to PVDF membranes (Bio-Rad) using a Trans-Blot Cell system (Bio-Rad) in transfer buffer (25 mM Tris, 190 mM glycine, 10% methanol) at 40 V overnight. The following day, the membrane was probed for 1 hr with rabbit anti-Rb (C-15) antibody diluted 1:2000 in TBS buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 0.1% Tween, 1% BSA, 5% non fat milk, pH 7.5). After extensive washing, the membrane was incubated for 1 hr with HRP anti-rabbit immunoglobulin. The signals were detected by enhanced chemiluminescence using the supersignal system (Pierce) and quantified by densitometry. As a control, actin was simultaneously detected using a mouse anti-human actin antibody diluted 1:750, and then developed using horseradish peroxidase linked to anti-mouse immunoglobulin and the same chemiluminescence system.

Chromatin immunoprecipitation assay

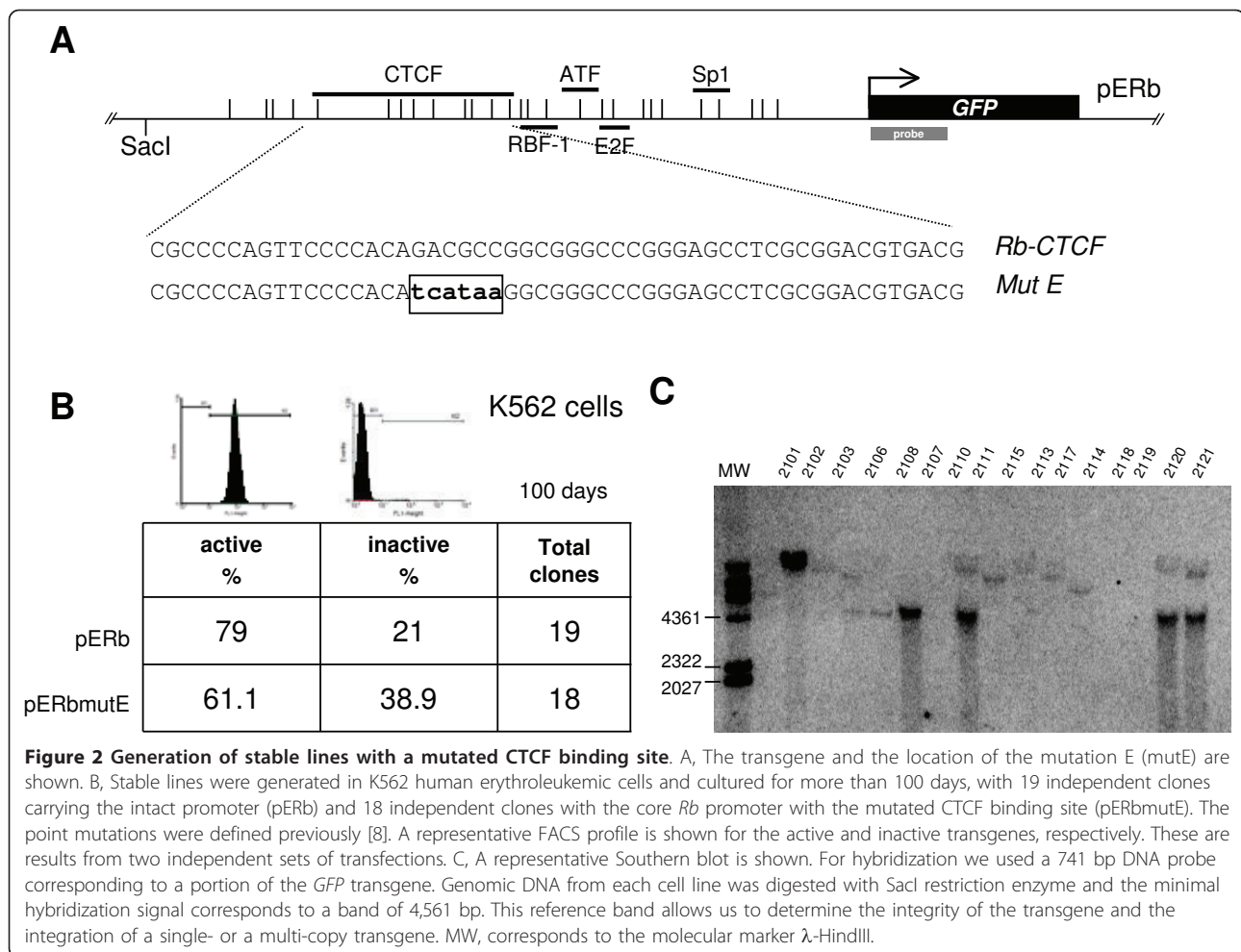
ChIP assays were performed as described previously [8]. Briefly, U87MG glioma cells (2×10^7 cells) were fixed

with 1% formaldehyde and then neutralized by adding 0.125 M glycine. Cells were collected and lysed in Cell Lysis buffer (5 mM EDTA pH 8.0, 50 mM de TRIS-HCl pH 8.1, 1% SDS, protease inhibitor cocktail). The nuclei lysate was sonicated to obtain soluble chromatin with an average length of 500 bp. After 1:10 dilution with dilution buffer (20 mM Tris-Cl, pH 8.1, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100), chromatin solutions were precleared and then incubated with or without 4 µg anti-CTCF, anti-acH3, anti-acH4 and anti-H3K27me3 antibodies, then the mixture was incubated at 4°C overnight on a rotating platform. The same immunocomplexes were recovered with protein A-Sepharose beads. After extensive washing, the bound DNA fragments were eluted, and the resulting DNA was subjected to PCR reactions using the following primer pairs: RbPromFw/RbPromRev for the endogenous *Rb* promoter and RbPromFw/Hec02r for the stable transgene. As a negative control primers RTRb-F/RTRB-R were used to amplify exon 27 of the *Rb* gene. PCR products were separated by gel electrophoresis on a 2% agarose gel and visualized. Primer used: RbPromFw: 5'-CCAGACTCTTTGTATAGCC-3'; HEC02R: 5'-ACCATGGTGGCGACC-3'; RTRb-F: 5'-AAGTACCCATCTAG-TACT-3'; RTRb-R: 5'-AAGTTACAGCATCTCTAAA-3'; Igf2-CTCF-Fwd: 5'-CAGGCTCCCCAAAATCTA-3'; Igf2-CTCF-Rvs: 5'-GGGAACATAGAGAAAGAGG-3'; Retinoblastoma Exon 27: RTRb-F 5'-AAGTACCCATC-TAGTACT-3' and RTRb-R: 5'-AAGTTACAGCATCTC-TAAA-3' [8].

Results

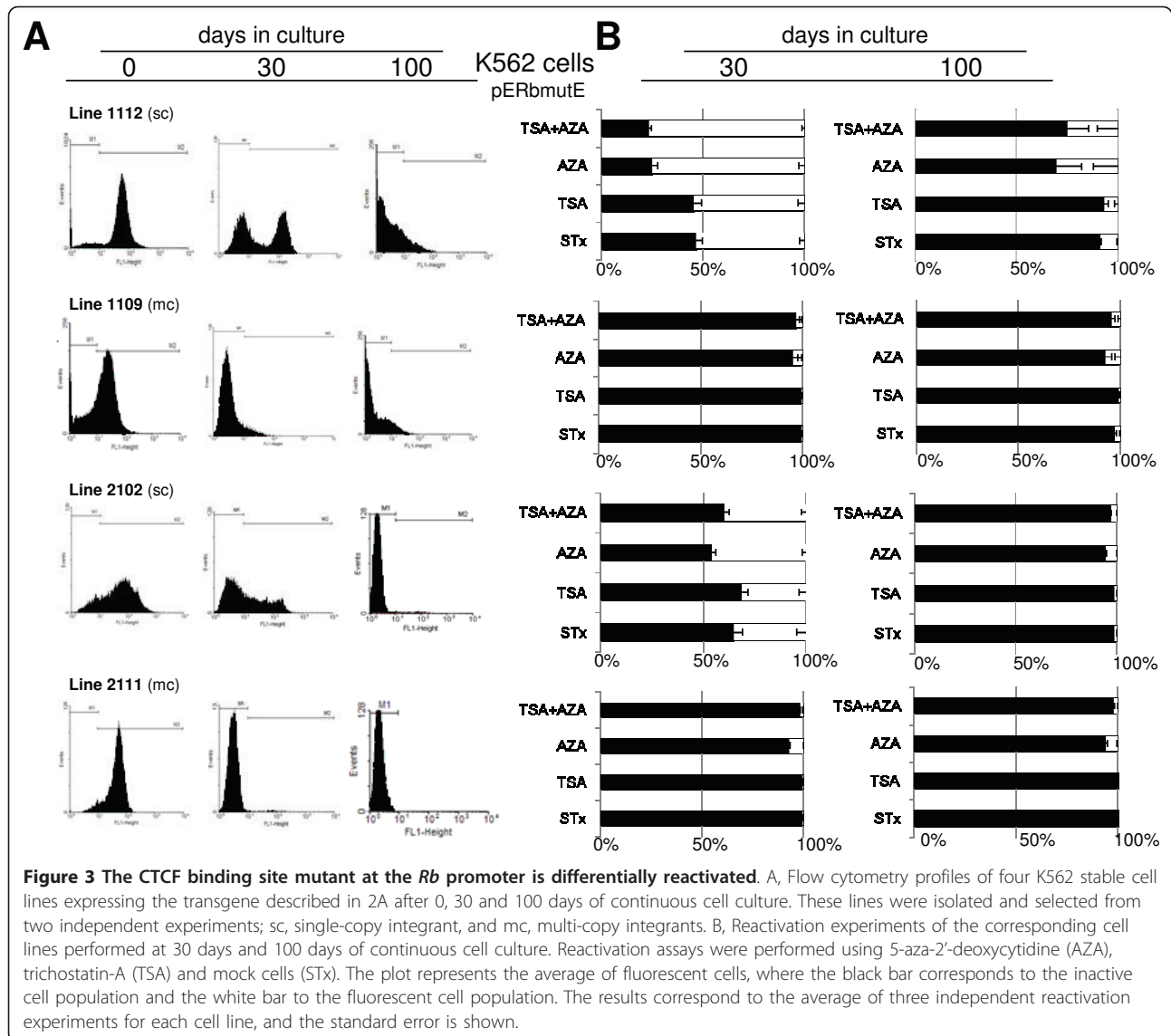
Retinoblastoma promoter DNA methylation increases over time in cell culture

With the aim of further understanding the DNA methylation dynamics over the *Rb* promoter, we performed sodium bisulfite genomic DNA transformation and sequencing of the core promoter at 130 and 170 days of continuous cell culture (Figure 1A). The DNA methylation status was analyzed over a transgene that was stably integrated in HeLa cells [8]. Using the same cell line we had previously demonstrated a modest gain of DNA methylation (at 100 days in culture) with severe consequences on gene expression [8]. Here we found that after additional cell divisions there was a gradual but not dramatic increase in DNA methylation (Figure 1B). After 130 days, 14% DNA methylation was reached, and after 170 days, 22%. At this last time point we found an increase in the methylated CpG dinucleotides located preferentially over the CTCF, RBF-1 and E2F binding motifs (Figure 1B). These results suggest that after prolonged cell culture and many cell divisions there is a gain of DNA methylation, which reinforces epigenetic silencing.



Reactivation conditions were previously established (Additional file 2, Figure S2) and transgene activity was followed at 30 and 100 days of continuous cell culture. Interestingly, we found that a significant reactivation was observed at early time points of cell culture (30 days) using each of the inhibitors or their combination. A more pronounced reactivation was observed when the 5-azadC inhibitor was tested compared to TSA treatment (Figure 3B). Of note, single-copy integrants were more efficiently reactivated in comparison to multi-copy integrants (Figure 3B). This observation may be related to evidence demonstrating that multi-copy integrants can be recognized as repetitive sequences that induce the formation of heterochromatin [17-19]. Unexpectedly, at 100 days in cell culture the reactivation became modest. The DNA methylation status of the reactivated cell line 1112 and 2111, and a new and independent cell line 2102, were assessed (Additional file 3, Figure S3). Thus, in these series of reactivation experiments, using the 5-azadC inhibitor, DNA methylation was partially lost indirectly demonstrating that DNA methylation is one of the causes of silencing.

These results could appear contradictory to our previous observations where we observed 60% reactivation using 5-azadC in a HeLa cell line [8], but this seems not to be the case since that cell line, which carried an intact CTCF sequence, was previously sorted from a clone that was partially silenced after 100 days in continuous cell culture [8]. Additionally in the same previous work, we found similar reactivation levels at early time points, as observed here in the context of the mutant CTCF sites, which are more rapidly and robustly silenced. These results exemplify two different processes leading to the establishment of an epigenetic silencing conformation over the *Rb* core promoter. We believe that at early time points (30 days), DNA methylation is progressively and actively incorporated without reaching critical densities or resulting in the methylation of specifically located CpG dinucleotides. This is likely because this sort of intermediate state of DNA methylation can be efficiently reverted. In contrast, at later times of cell culture (100 days or more), histone deacetylation appears to be irreversible, but



DNA methylation is partially erased suggesting that other repressive histone marks and nuclear factor complexes have been established. One attractive possibility is the gain of the histone H3K27me3 mark, a repressive mark incorporated by members of the Polycomb group repressor proteins.

DNA hypermethylation of the *Rb* promoter in a transgene with a mutated CTCF binding site

Next, we assessed the DNA methylation status of two of the stable cell lines generated with the mutated CTCF binding site. These cell lines were previously tested in the reactivation experiments (Figure 4; cell lines 1112 and 2111). For comparison we evaluated the DNA methylation over a transgene in a K562 stable line in which the *Rb* promoter was intact

(Figure 4A). In agreement with previous observations, we found that there was no significant DNA methylation at day 30 of continuous cell culture even though transgene expression started to decay (see Figure 4B). Instead, after 100 days in culture the 1112 and 2111 cell lines became DNA hypermethylated (Figure 4C). This result is consistent with the inability of CTCF to bind to the transgene *Rb* promoter. This was further confirmed by bisulfite sequencing of the K562 endogenous *Rb* promoter, where we found less than a 2-fold gain of DNA methylation (Additional file 4, Figure S4). Taken together, these results demonstrate that CTCF is a critical factor that contributes to the epigenetic protection of the *Rb* core promoter, which in the absence of CTCF binding, is prone to DNA hypermethylation.

of CTCF from its recognition sequence causes an increase in DNA methylation and the rapid gain of a repressive chromatin configuration over the *Rb* promoter.

The concept of genomic boundaries and the propagation of repressive chromatin structures from nucleation sites has been suggested previously [22]. Data from our research group supports this view on the basis of the multifunctional activity of the 11-zinc-finger nuclear factor CTCF [11,23]. The involvement of CTCF in cancer and in particular, in the epigenetic regulation of tumor suppressor genes, is further supported by recent data from other laboratories studying the *BRCA1* and *p16^{INK4a}* tumor suppressor genes, or even the apoptotic gene *PUMA* [8-10,12,24]. In addition, CTCF has been proposed to participate in genome organization through lamin and cohesin interactions, and in delineating transitions between open and repressive chromatin regions at the genome-wide scale [25,26]. Thus, several lines of evidence, both at the local and genome-wide scales, support the contribution of CTCF to the optimal regulation of a significant number of genes.

Coincident with other studies, the mechanisms associated with gene silencing and reactivation assays remain controversial. An interesting result shown here is the capacity to partially reactivate silenced stable cell lines at early culture times, and the incapacity to achieve reactivation at later time points (Figure 3). These results are similar to those observed by Baylin and collaborators, where they concluded that DNA methylation inhibition does not reverse a repressive chromatin conformation and a silenced state in cancer cells [27,28]. In colorectal cancer cells the histone H3K27me3 repressive mark seems to be the preferential source of epigenetic silencing of the *hMLH1* gene promoter [27]. Another possibility that can be independent of DNA methylation is the formation of higher order chromatin structures that can participate in gene repression [28]. The complexity of these processes is exemplified by the depletion of the Polycomb protein EZH2, which is responsible for the trimethylation of histone H3 lysine 27 and the persistence of DNA methylation. The variety of epigenetic silencing mechanisms appears to depend on the affected genes and the type of tumoral cell analyzed [29,30].

It is worth mentioning that we observe variations in the capacity to inhibit DNA methylation when we compare different stable lines after 30 days of continuous cell culture. For example, transgene expression of the 2111 cell line was rapidly silenced but no significant gain of DNA methylation was detected at 30 days of culture (Figure 3 and 4). In contrast, for the 1112 cell line a reactivation of the transgene was observed corresponding to around 10% de-methylation after 30 days in culture (Figure 3 and

Additional file 3, Figure S3). These data suggest that DNA methylation may not always be the initial silencing event. Several interpretations can be considered, among them, variations from line to line due to chromosomal position effects caused by different transgene integration sites. Extrapolating these findings to the endogenous context, one possibility is that more distal genomic sequences may possibly gain DNA methylation that causes, either directly or indirectly, *Rb* gene silencing in the absence of CTCF binding [31]. We also cannot discard the possibility that DNA methylation is affecting the expression of a co-regulator of CTCF, such as the poly-ADP-ribosyl polymerase 1, among others [32].

However, DNA methylation does not seem to be the only source of silencing. We postulate that the features of the CpG-island associated with each promoter can dictate its mechanism of silencing and that CTCF protects those promoters in the absence of DNA methylation, like in the case of the human *p53* gene promoter [9]. Another aspect that remains unexplored is the reason for aberrant CTCF function. One scenario could be related to the post-translational modifications that CTCF is subject to, like phosphorylation and poly(ADP-ribosyl)ation [32]. Interestingly, it has been recently demonstrated that CTCF and PARP-1-dependent poly(ADP-ribosyl)ation can induce DNA hypomethylation by inhibiting the DNA methyltransferase Dnmt1 [33]. Thus, in cancer a deregulation of CTCF-PARP-1 poly(ADP-ribosyl)ation levels may cause the activation of Dnmt1 and the local hypermethylation of the *Rb* promoter.

Our results show that over long periods of time, other repressive mechanisms in addition to DNA methylation can participate in *Rb* promoter epigenetic silencing. We postulate that non-coding RNAs can perform such role, acting in *cis* or *trans*, like the long non-coding RNAs HOTAIR and lincRNA-p21 [34,35].

Conclusion

CTCF plays an important role in maintaining regulatory regions of certain genes in optimal chromatin configurations. On the basis of the data accumulated by our group and other laboratories, it is now critical to begin addressing mechanistic questions concerning the aberrant performance of CTCF in cancer cells. Moreover, it is time to go forward and consider CTCF as a potential tumor suppressor gene or molecular marker for different types of tumors.

Additional material

Additional file 1: Figure S1. Flow cytometry profiles of stably transfected K562 cells expressing the GFP reporter gene under the control of the *Rb* promoter with a wild-type and mutated CTCF binding site. Individual lines carrying the pErB transgene (left panel)

that includes the intact *Rb* promoter (as shown in Figure 1A and 2A), and the same transgene with the CTCF binding site mutated, pERbmutE, are shown (right panel). Each individual cell line was isolated in soft-agar in the presence of drug-selection and the integrity of the transgene for each cell line was confirmed by Southern blotting, as described in the legend for Figure 2C. Single-copy and multi-copy integrants were determined in this way. Note that for the intact *Rb* promoter the great majority of established cell lines are robustly active even after 100 days of continuous cell culture. Few exceptions are found, like line 012 in which the transgene is probably subject to a strong repressive effect due to its genomic integration site, but in general we consider the *Rb* promoter to be a "strong" promoter. When the CTCF binding sequence is mutated (pERbmutE), a rapid expression extinction of the transgene is observed with, in addition, more variable levels of expression, suggesting that the transgene is more prone to chromosomal position effects under these conditions.

Additional file 2: Figure S2. Standardization of the DNA methylation and histone deacetylation inhibitor concentrations. Representative FACS profiles are shown with the corresponding inhibitor concentrations. Graphs summarizing the percentage of *GFP* expression reactivation are shown.

Additional file 3: Figure S3. DNA methylation status of the human *Rb* promoter after 5-azadC inhibitor treatment. To analyze the degree of de-methylation, we analyzed the stably transformed K562 cell line 2102 (mc; single-copy) and line 1112 (sc; single-copy), which were maintained in continuous cell culture for 100 days. We isolated genomic DNA from each cell line and performed sodium bisulfite sequencing.

Additional file 4: Figure S4. DNA methylation analysis of the endogenous human *Rb* promoter. A, For comparison purposes we used a wild-type *Rb* promoter-GFP transgene in K562 cells that is transcriptionally active after 100 days of cell culture. B, Endogenous DNA methylation status of the *Rb* promoter in the K562 cell lines 1112 and 2111 at 30 days of cell culture. C, This panel is similar to B and corresponds to both cell lines at 100 days of cell culture. Individual (for each CpG) and global DNA methylation percentages are indicated.

Abbreviations

The abbreviations used are: *CTCF*: CCCTC-binding factor; *ChIP*: Chromatin immunoprecipitation; *Rb*: retinoblastoma gene; *GFP*: Green Fluorescent Protein.

Acknowledgements

We thank Catherine Farrell and Ricardo Saldaña-Meyer for critical reading of the manuscript, and members of Félix Recillas-Targa's laboratory for constant scientific discussions. We thank L. Ongay, G. Codiz and M. Mora from the Unidad de Biología Molecular, IFC-UNAM, for the DNA sequencing and FACS facility. We thank the excellent technical assistance of Georgina Guerrero. This work was supported by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Universidad Nacional Autónoma de México (IN209403, IN214407 and IN203811) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT: 42653-Q, 58767 and 128464). MD-S, MF-M, EG-B and CV-Q and EA-O are supported by a Ph.D. fellowship from CONACyT (162257, 170087, 207998, 207086 and 215758) 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 Bioquímicas, UNAM.

Authors' contributions

MDS and FRT designed the experiments. MDS, MFM and FRT wrote and revised the manuscript. MDS performed the majority of the experiments. CVQ and EAO performed CIP assays. EGB and CVQ performed cell culture and expression experiments. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 25 October 2010 Accepted: 10 June 2011
Published: 10 June 2011

References

1. Jones PA, Baylin SB: The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Cell* 2007, **128**:683-92.
2. Robertson KD: DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 2005, **6**:597-610.
3. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rabhan M, Schübeler D: Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 2007, **39**:457-66.
4. Mohn F, Schübeler D: Genetics and epigenetics: stability and plasticity during cellular differentiation. *Trends Genet* 2009, **25**:129-36.
5. Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, Herb B, Ladd-Acosta C, Rho J, Loewer S, Miller J, Schlaeger T, Daley GQ, Feinberg AP: Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet* 2009, **41**:1350-3.
6. 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, Issa JP: Gene silencing in cancer by histone H3 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet* 2008, **40**:741-50.
7. Coolen MW, Storzaker C, Song JZ, Stathan AL, Kassir Z, Moreno CS, Young AN, Varma V, Speed TP, Cowley M, Lacaze P, Kaplan W, Robinson MD, Clark SJ: Consolidation of the cancer genome into domains of repressive chromatin by long-range epigenetic silencing (LRES) reduces transcriptional plasticity. *Nat Cell Biol* 2010, **12**:235-46.
8. De La Rosa-Velázquez IA, Rincón-Arango H, Benítez-Bribiesca L, Recillas-Targa F: Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. *Cancer Res* 2007, **67**:2577-85.
9. Soto-Reyes E, Recillas-Targa F: Epigenetic regulation of the human p53 gene promoter by the CTCF transcription factor in transformed cell lines. *Oncogene* 2010, **29**:2217-27.
10. Butcher DT, Mancini-DiNardo DN, Archer TK, Rodenhiser DI: DNA binding sites for putative methylation boundaries in the unmethylated region of the BRCA1 promoter. *Int J Cancer* 2004, **111**:669-78.
11. Recillas-Targa F, De La Rosa-Velázquez IA, Soto-Reyes E, Benítez-Bribiesca L: Epigenetic boundaries of tumour suppressor gene promoters: the CTCF connection and its role in carcinogenesis. *J Cell Mol Med* 2006, **10**:554-68.
12. Witcher M, Emerson BM: Epigenetic silencing of the *p16^{INK4a}* tumor suppressor is associated with loss of CTCF binding and a chromatin boundary. *Mol Cell* 2009, **34**:271-84.
13. Ohtani-Fujita N, Dryia TP, Rapaport JM, Fujita T, Matsumura S, Ozasa K, Watanabe Y, Hayashi K, Maeda K, Kinoshita S, Matsumura T, Ohnishi Y, Hotta Y, Takahashi R, Kato MV, Ishizaki K, Sasaki MS, Horsthemke B, Minoda K, Sakai T: Hypermethylation in retinoblastoma gene is associated with unilateral, sporadic retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1997, **98**:43-9.
14. Simpson DJ, Hibberts NA, McNicol AM, Clayton RN, Farrell WE: Loss of pRb expression in pituitary adenomas is associated with methylation of the Rb1 CpG island. *Cancer Res* 2000, **60**:1211-6.
15. Nakamura M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H: Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab Invest* 2001, **81**:77-82.
16. Joseph B, Mamatha G, Raman G, Shanmugan MP, Kumaramanickavel G: Methylation status of RB1 promoter in indian retinoblastoma patients. *Cancer Biol Ther* 2004, **3**:184-7.
17. Garrick D, Fiering S, Martin DJ, Whitelaw E: Repeat-induced gene silencing in mammals. *Nat Genet* 1998, **18**:56-9.
18. Recillas-Targa F, Valadez-Graham V, Farrell CM: Prospects and implications of using chromatin insulators in gene therapy and transgenesis. *BioEssays* 2004, **26**:796-807.
19. Calero-Nieto FJ, Bert AG, Cockerill PN: Transcription-dependent silencing of inducible convergent transgenes in transgenic mice. *Epigenet Chromat* 2010, **19**:3.
20. Bell AC, Felsenfeld G: Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* 2000, **405**:482-5.
21. Szabó P, Tang SH, Rentsendorj A, Pfeifer GP, Mann JR: Maternal-specific footprints at putative CTCF sites in the H19 imprinting control region give evidence for insulator function. *Curr Biol* 2000, **10**:607-10.

22. Issa JP: CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004, **4**:988-93.
23. Phillips JE, Corces VG: CTCF: master weaver of the genome. *Cell* 2009, **137**:1194-211.
24. Gomes NP, Espinosa JM: Gene-specific repression of the p53 target gene PUMA via intragenic CTCF-cohesin binding. *Genes Dev* 2010, **24**:1022-34.
25. Jothi R, Cuddapah S, Barski A, Cui K, Zhao K: Genome-wide identification on *in vivo* protein-DNA binding sites from ChIP-Seq data. *Nucleic Acids Res* 2008, **16**:5221-31.
26. Bose T, Gerton JL: Cohesinopathies, gene expression and chromatin organization. *J Cell Biol* 2010, **189**:201-10.
27. McGarvey KM, Fahrner JA, Greene E, Martens J, Jenuwein T, Baylin SB: Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatin chromatin state. *Cancer Res* 2006, **66**:3541-9.
28. Tiwari VK, McGarvey KM, Licchesi JD, Ohm JEm Herman JG, Schübeler D, Baylin SB: PcG proteins, DNA methylation, and gene repression by chromatin looping. *PLoS Biol* 2008, **6**:2911-27.
29. McGarvey KM, Greene E, Fahrner JA, Jenuwein T, Baylin SB: DNA methylation and complete transcriptional silencing of cancer genes persist after depletion of EZH2. *Cancer Res* 2007, **67**:5097-102.
30. 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, Issa JP: Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet* 2008, **40**:741-50.
31. Jiang Z, Guo Z, Saad FA, Ellis J, Zacksenhaus E: Retinoblastoma gene promoter directs transgene expression exclusively to the nervous system. *J Biol Chem* 2001, **276**:593-600.
32. Farrar D, Rai S, Chernukhin I, Jagodic M, Ito Y, Yammine S, Ohlsson R, Murrell A, Klenova E: Mutational analysis of the poly(ADP-ribosylation) sites of the transcription factor CTCF provides an insight into the mechanism of its regulation by poly(ADP-ribosylation). *Mol Cell Biol* 2010, **30**:1199-216.
33. Guastafierro T, Cecchinelli B, Zampieri M, Reale A, Riggio G, Sthandier O, Zupi G, Calabrese L, Caiafa P: CCCTC-binding factor activates PARP-1 affecting DNA methylation machinery. *J Biol Chem* 2008, **283**:21873-80.
34. Gupsta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, Tsai MC, Hung T, Argani P, Rinn JL, Wang Y, Brzoska P, Kong B, Li R, West RB, van de Vijver MJ, Sukumars, Chan HY: Long non-coding RNA HOTAIR mediates global gene repression in the p53 response. *Cell* 2010, **142**:409-19.
35. Huarte A, Guttman M, Feldser D, Garber M, Koziol MJ, Kenzelmann-Broz D, Khalil AM, Zuk O, Amit I, Rabani M, Attardi LD, Regev A, Lander ES, Jacks T, Rinn JL: A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell* 2010, **142**:409-19.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/11/232/prepub>

doi:10.1186/1471-2407-11-232

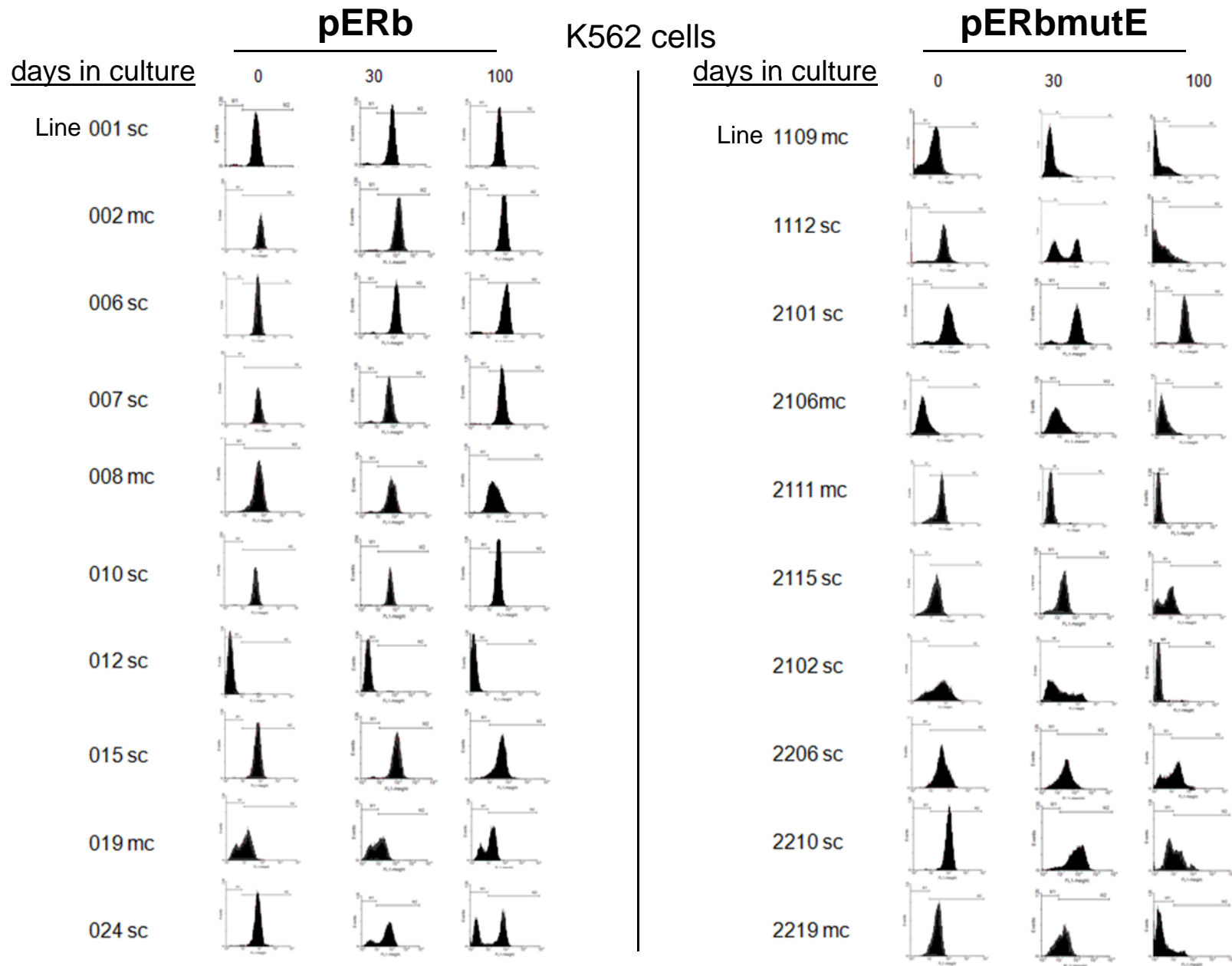
Cite this article as: Dávalos-Salas et al.: Gain of DNA methylation is enhanced in the absence of CTCF at the human *retinoblastoma* gene promoter. *BMC Cancer* 2011 **11**:232.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

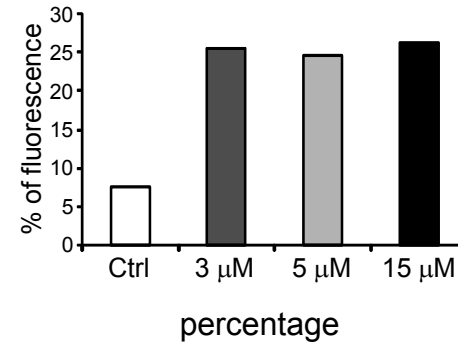
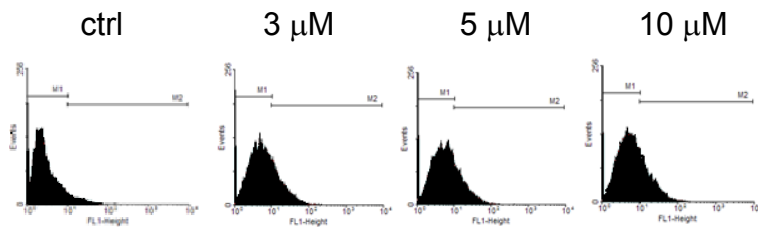
Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





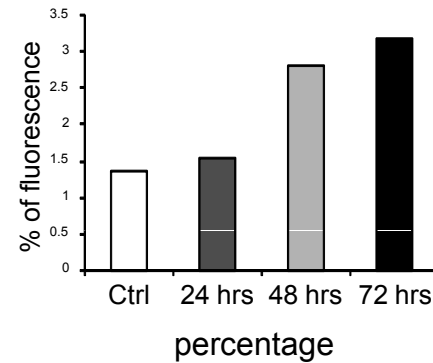
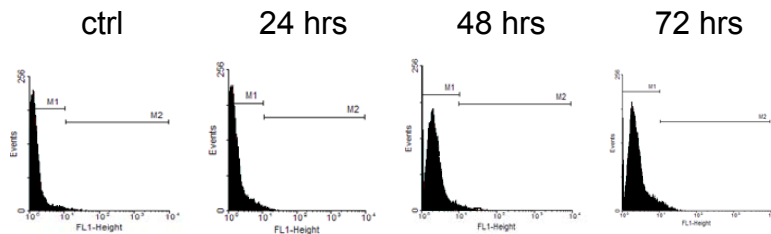
Supplementary Figure S1

Concentration curve of 5-aza-2'-deoxycytidine



5'-azadC 48hrs	% Positives
CONTROL	7.49
3 μM	25.55
5 μM	24.7
15 μM	26.16

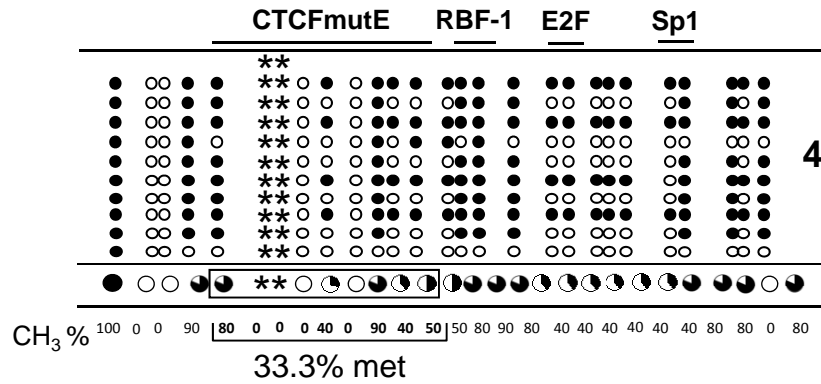
Temporal course of Trichostatin-A treatment (15 ng/ml)



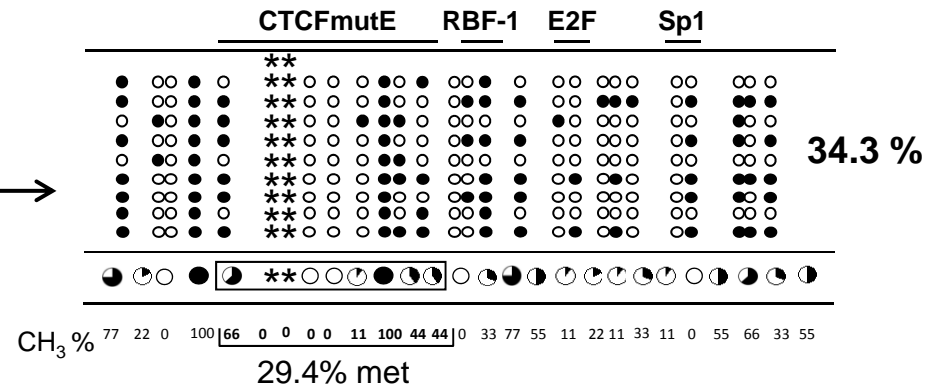
TSA 15 ng/ml	% Positives
CONTROL	1.36
24 hrs	1.54
48 hrs	2.8
72 hrs	3.18

Supplementary Figure S2

A Line 1112 no treatment

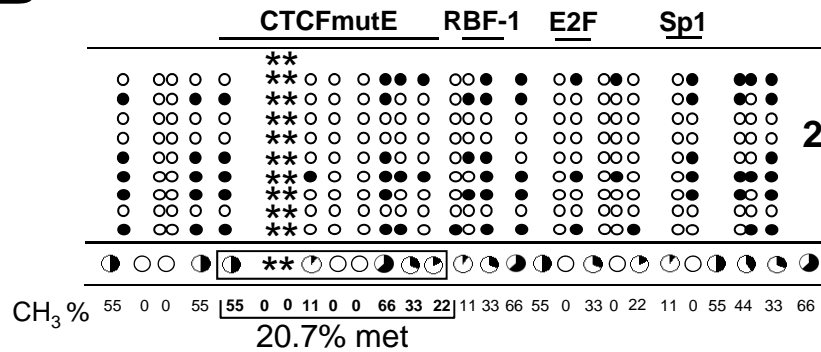


Line 1112 with azadC

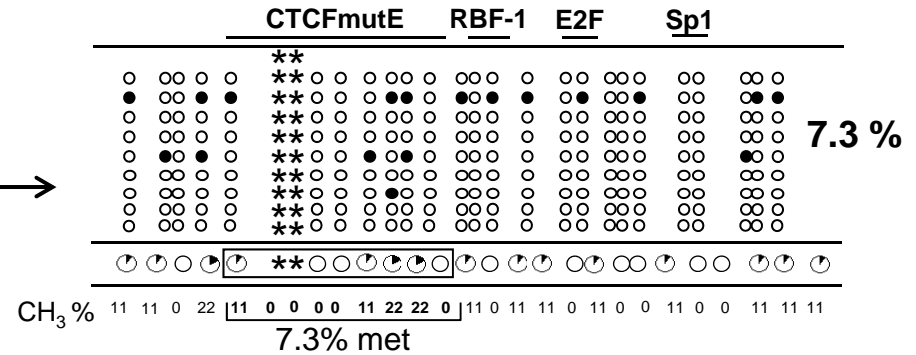


48.1 %

B Line 2111 no treatment

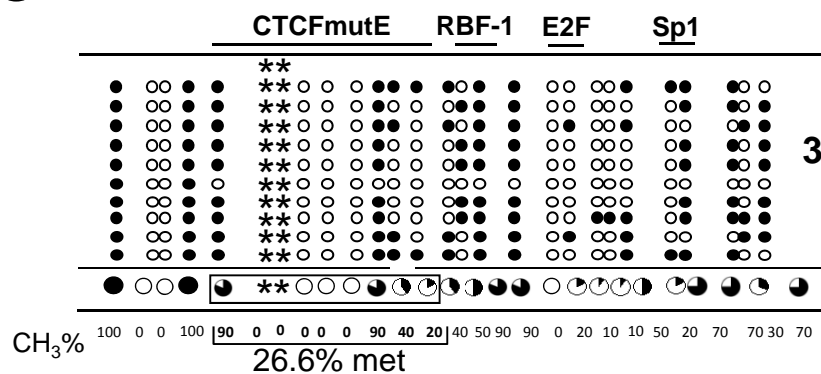


Line 2111 with azadC

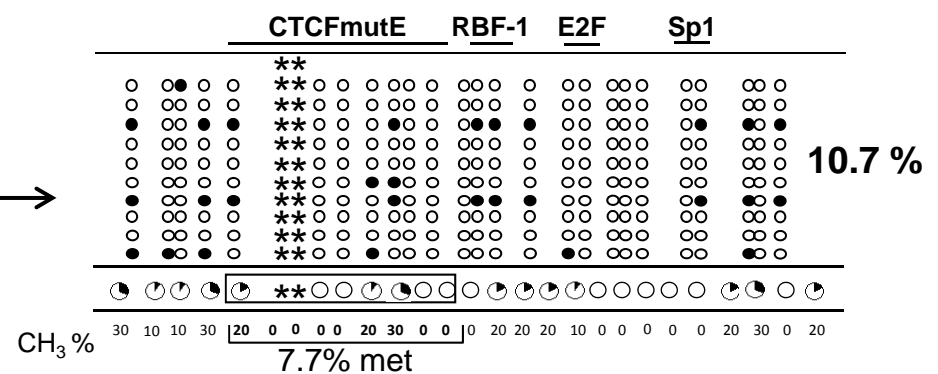


26.8 %

C Line 2102 no treatment



Line 2102 with azadC



39.2 %

Supplementary Figure S3

LA VÍA Rb/E2F Y LA FAMILIA DE PROTEÍNAS REPRESORAS POLYCOMB EN EL DESARROLLO DE CÁNCER

MERCEDES IMELDA DÁVALOS-SALAS Y FÉLIX RECILLAS-TARGA*

Instituto de Fisiología Celular, Depto. de Genética Molecular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-242 México, 04510, D.F. *E-mail: frecilla@ifc.unam.mx

RESUMEN

El control adecuado del ciclo celular mediante la acción coordinada de la familia de factores de transcripción E2F resulta ser clave para la homeostasis celular. El entender su modo de acción desde una perspectiva epigenética resulta ser un tema de gran actualidad y cambia la visión de cómo es regulado el ciclo celular. Uno de los principales reguladores epigenéticos está conformado por el grupo de proteínas Polycomb (PcG), relacionadas con procesos patológicos como el cáncer, a través de la desregulación a nivel epigenético de genes supresores de tumores como *BRCA1*, *p16* y *p53*, entre otros. Con relación a lo anterior, la regulación del gen supresor *Retinoblastoma (Rb)* ha sido ampliamente estudiado dada su importante participación como regulador negativo del ciclo celular, pero más reciente se ha demostrado que su modo de acción está relacionado con el grupo de proteínas PcG. Cada uno de los procesos que involucran a componentes de la familia de factores E2F, los miembros de Polycomb y la familia de proteína Rb, parecen ser en cierta medida independientes y, por ende, poco relacionados. Sin embargo, existen evidencias de una convergencia a nivel epigenético en la acción de estos conjuntos de moléculas reguladoras de la progresión del ciclo celular y su desregulación nos puede llevar a entender mejor su contribución al desarrollo de procesos patológicos como el cáncer.

Palabras Clave: *Cáncer, E2F, epigenética, Polycomb, Rb.*

ABSTRACT

The coordinated contribution of the E2F-family of transcription factors is critical for the proper control of the cell cycle with consequences in the cellular homeostasis. Such kind of regulation requires a renewed vision of the control of the cell cycle through the basis of epigenetic mechanisms. One of such regulatory components is the Polycomb Group (PcG) of proteins which have been involved in cancer development through the anomalous regulation, at an epigenetic level, of tumour suppressor genes such as *BRC1*, *p16*, and *p53*, among others. In particular, the tumour suppressor gene *Retinoblastoma (Rb)* plays a central role in the regulation of the cell cycle and is regulated by PcG proteins. The relationship among E2F members, PcG and Rb has not been examined in detail. Here, we describe the epigenetic interaction among these proteins, their association with epigenetic processes and their contribution to cancer development.

Key Words: *Cancer, E2F, epigenetic, Polycomb, Rb.*

INTRODUCCIÓN

Hace más de un siglo que se sugirió que la herencia o adquisición de anomalías genéticas predispone a algunos individuos a padecer cáncer. Pero no fue sino hasta hace dos décadas, con el desarrollo de las tecnologías de la biología molecular, que se han identificado

genes asociados con mayor frecuencia al desarrollo del cáncer. Entre dichos genes se encuentran los oncogenes (que codifican proteínas con ganancia dominante de función) y los genes supresores de tumores (que codifican proteínas con pérdida recesiva de función) los cuales fueron descubiertos principalmente por su alteración en la mayoría de los cánceres humanos^[1]. Gran parte del conocimiento de estos genes fue generado por estudios bioquímicos y funcionales hechos en células en cultivo, aunque la mayoría de la información actual que

Nota: Artículo recibido el 11 de febrero de 2011 y aceptado el 06 de abril de 2011.

explica su contribución en el desarrollo de cáncer, proviene del estudio de su función anormal en modelos animales.

En la última década, con los crecientes avances científicos y tecnológicos, se ha generado un interés cada vez mayor por seguir entendiendo a niveles más finos el funcionamiento de las células. Actualmente se sabe que la desregulación de procesos vitales para la fisiología celular lleva a estados críticos y anormales, que si se mantienen en el tiempo, pueden ser la causa del desarrollo de algunas enfermedades crónico-degenerativas, entre ellas el cáncer. Dichas alteraciones fisiológicas pueden ser por ejemplo, el estrés oxidativo generado por fuentes tanto medio ambientales, como físicas y químicas, las cuales, si ocurren de manera persistente, tienen diferentes consecuencias^[2]. Este tipo de estrés daña a las macromoléculas existentes en la célula y se sabe que la generación de aductos de ADN, de proteínas y de lípidos, producto de la oxidación, son factores que contribuyen en la patología de este tipo de enfermedades y, por otra parte, activan de manera anormal vías de señalización involucradas en la proliferación y diferenciación celular. Otro tipo de alteración frecuente que también tiene relación con el desarrollo de enfermedades, es la desregulación de procesos epigenéticos como: la modificación post-traduccional de histonas, la metilación del ADN, la actividad de complejos remodeladores de la cromatina ATP-dependientes, la actividad de complejos Polycomb (PcG) y Trithorax (TrxG), los mecanismos de los ARN no-codificantes y la participación de la organización y dinámica nuclear, que se sabe, están involucrados en casi todos los procesos relacionados con la homeostasis celular^[3,4]. Todos estos procesos epigenéticos mencionados ocurren en el núcleo celular en el contexto de la cromatina y, para clarificar su estudio, es necesario empezar por definir a grandes rasgos algunos conceptos básicos.

Para poder entender mejor los procesos vinculados a la regulación epigenética presentamos brevemente una descripción de cómo el genoma se estructura y organiza en cromatina. En las células eucariontes el ADN está enrollado alrededor de un octámero de histonas, dos moléculas de cada una de las histonas H3, H4, H2A y H2B, para formar el nucleosoma, la unidad primaria que conforma la cromatina. Los nucleosomas compactan el genoma y restringen el acceso y reconocimiento del ADN a los factores de transcripción, de tal manera que existe un balance entre un empaquetamiento efectivo del genoma y la accesibilidad de proteínas reguladoras^[5]. A esta regulación contribuyen la actividad de enzimas que reposicionan, reconfiguran o disocian nucleosomas llamadas genéricamente “remodeladores de la cromatina”, así como la actividad de enzimas modificadoras de histonas, llamadas “modificadores de la cromatina”, como las proteínas histona acetiltransferasa (HAT), las proteínas histona metiltransferasa (HMT) las proteínas histona desacetilasa (HDAC) y las proteínas ADN metiltransferasas (DNMT1, DNMT3a y DNMT3b)^[6]. Evidencia de la importancia que tiene la actividad de este tipo de proteínas en procesos celulares es el hecho de que algunas enzimas HMT, forman parte del

complejo represor Polycomb (PcG). Este grupo fue inicialmente descrito en *Drosophila melanogaster* como proteínas reguladoras de los genes homeóticos durante el desarrollo^[7]. Así mismo, un grupo de factores de transcripción que se asocian con las proteínas PcG y que participan en la regulación del ciclo celular son las proteínas de la familia E2F que describiré en la siguiente sección.

Antes de describir los mecanismos de acción de los complejos Polycomb, es necesario recordar algunos conceptos básicos sobre las modificaciones post-traduccionales que sufren las histonas. Como se sabe, algunas de estas modificaciones post-traduccionales son la acetilación, la fosforilación, la ubiquitinación y la metilación, entre otras^[8]. Dichas modificaciones ocurren con mayor frecuencia en los residuos de los extremos amino terminal de las histonas, aunque también se pueden presentar en algunos residuos más internos. La metilación es una de las marcas de histonas relacionadas con PcG, en particular la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3), modificación que correlaciona con cromatina transcripcionalmente inactiva. En el genoma esta marca puede presentarse en tres diferentes formas, mono, di y trimetilación (H3K27me1, H3K27me2 y H3K27me3, respectivamente). La abundancia relativa de cada una de estas marcas es diferente, siendo la más abundante la H3K27me2, la cual constituye aproximadamente el 50% de toda la H3K27 metilada *in vivo*. En contraste, la H3K27me1 y la H3K27me3 representan alrededor del 25% y 10%, respectivamente^[9]. Un ejemplo donde la H3K27me3 se encuentra enriquecida, es el proceso asociado a la inactivación del cromosoma X^[10]. De igual forma, H3K27me1 se localiza principalmente en regiones de heterocromatina pericentromérica^[11], aunque existe un estudio genómico de alta resolución en 2007, donde inesperadamente se encontró enriquecida esta marca en mayor proporción en promotores activos que en los silenciados^[12]. Estos hallazgos, aunque parezcan contradictorios, refrendan conceptos como el de que existe un “código de histonas”, lo que significa que en la mayoría de los casos no es sólo una modificación de histonas lo que produce un efecto molecular, sino la combinatoria de más de una modificación en las histonas, aunque sea una la marca representativa de un estado transcripcional específico.

En suma, el objetivo de esta revisión es abordar el aspecto relacionado con la contribución de estas dos familias de reguladores (PcG y E2F) en el control transcripcional a nivel de la cromatina, y entender su relación con el gen supresor de tumores Retinoblastoma, así como su participación en el desarrollo del cáncer.

LOS FACTORES TRANSCRIPCIONALES DE LA FAMILIA DE PROTEÍNAS E2F

El primer paso en la expresión génica es la transcripción. Dicha etapa está regulada a dos niveles, el primero por la estructura y las modificaciones en las histonas presentes en la cromatina, reconocidas por proteínas modificadoras de la cromatina, y

en segunda instancia por los factores de transcripción y sus co-factores y las polimerasas de ARN^[13]. Un grupo importante de factores de transcripción que se ha conservado durante la evolución desde invertebrados, peces y aves hasta mamíferos, son las proteínas E2F y cuya contribución es esencial para la regulación transcripcional de un grupo de genes responsables del control del ciclo celular^[14].

La familia de factores de transcripción E2F (Figura 1), nombrada así por la capacidad para unirse al promotor del gen *E2* de adenovirus, además de regular tanto positiva como negativamente la expresión de genes necesarios para la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, también regula otros genes necesarios para el control del ciclo^[15]. Entoces, la familia E2F está implicada en el control y regulación tanto de procesos celulares, como la mitosis, apoptosis, reparación del ADN y funciona como sensor de los puntos de revisión de daño al ADN, así como en la fisiología del organismo, por ejemplo la regulación de la diferenciación, el desarrollo y tumorigénesis. En general, la habilidad de los miembros de la familia E2F para regular estos

procesos ha sido relacionada a su capacidad para modular la respuesta transcripcional de sus promotores blanco^[16]. Actualmente se sabe que en la gran mayoría de los cánceres en humanos, la actividad de los factores E2F se encuentra desregulada a través de diferentes mecanismos y que, en general, la vía Rb/E2F es uno de los principales blancos. Algunos autores han demostrado lo vital que son estas moléculas a partir de la pérdida funcional de la proteína Rb, el aumento en la transcripción de la ciclina D que fosforila a Rb, la pérdida de p16, el cual es un inhibidor de cinasas dependiente de ciclina que inhibe la fosforilación de Rb, y la expresión de la oncoproteína E7 del virus del papiloma humano que secuestra a Rb e interfiere con la formación del complejo Rb-E2F (Figura 2)^[17,18].

En el genoma de mamíferos, las proteínas E2F están codificadas por ocho genes diferentes que dan lugar a nueve proteínas distintas (Figura 1). El único miembro de esta familia que codifica dos proteínas a través del uso de promotores alternativos, es el factor E2F3^[19]. Todas las proteínas E2F muestran un alto grado de identidad en su dominio de unión al ADN, lo cual se demostró

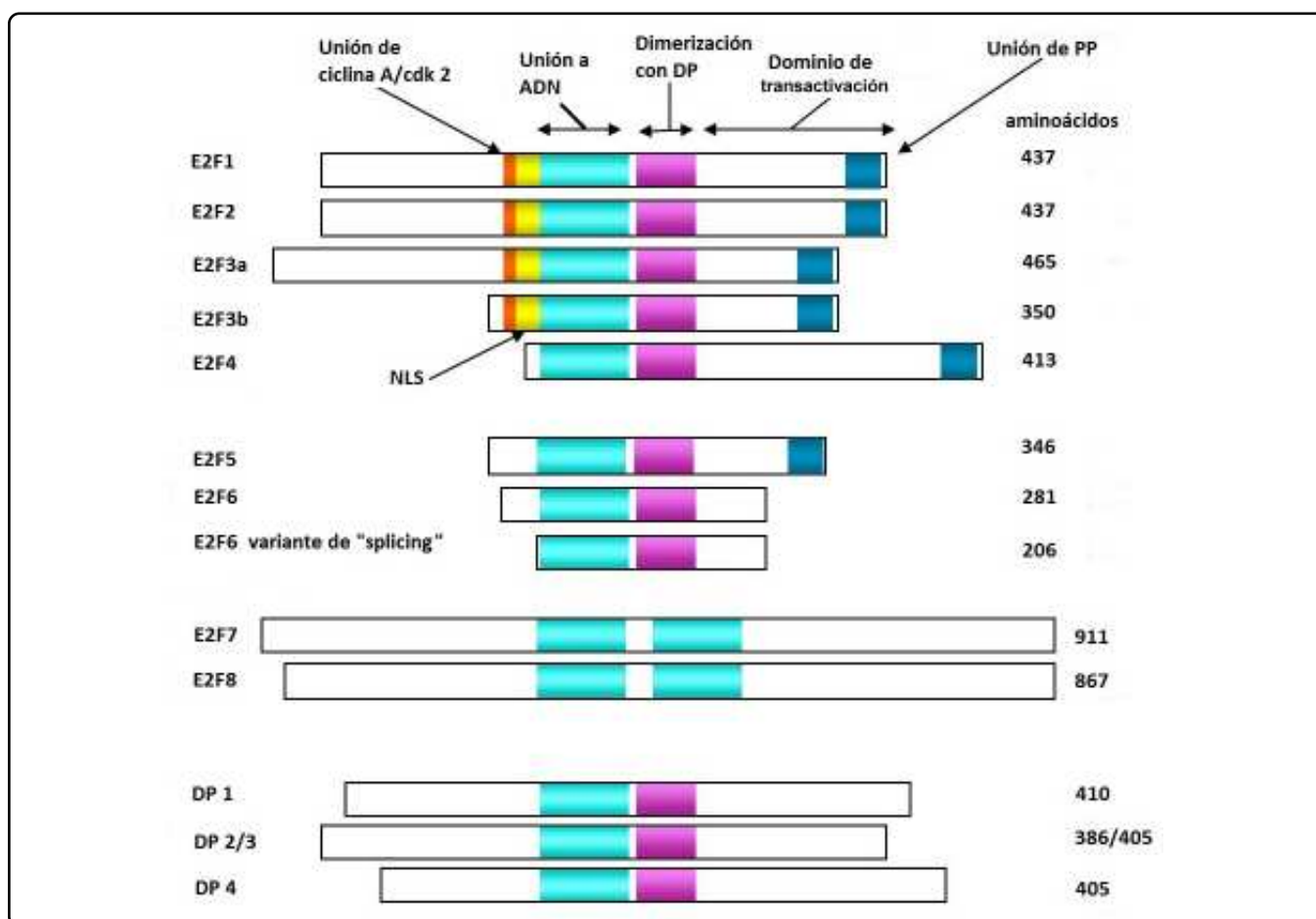


Figura 1. Esquema de la familia de proteínas E2F. En la imagen se muestran los diferentes dominios que se encuentran en cada una de las proteínas, así como su tamaño. NLS: señal de localización nuclear. PP: proteínas "pocket". DP: proteínas compañeras de dimerización. Modificado de De Gregory & Johnson^[14].

con estudios *in vitro*, donde se observó que todos los factores se pueden unir a la secuencia consenso 5'-TTTNNCGC-3' (donde N puede ser G o C).

La afinidad de unión de cada miembro de la familia a la secuencia mencionada, está determinada por la naturaleza de las seis bases centrales que conforman el motivo de unión, por el estado y tipo celular, y por la fase del ciclo en la que se encuentre la célula (parte central de la Figura 2)^[16]. Dicha unión también se ve afectada por la metilación del dinucleótido CpG en la secuencia consenso, interfiriendo con la unión de algunos miembros de la familia E2F y favoreciendo la incorporación de proteínas represoras como MeCP2, convirtiéndose esa región en un blanco de silenciamiento epigenético^[20]. En conjunto, estos aspectos contribuyen a explicar la amplia gama de genes blanco de la familia E2F y cómo es que en distintos momentos celulares los miembros de una misma familia pueden activar blancos incluso antagónicos. Cabe resaltar que algunos miembros de la familia de factores de transcripción E2F son los efectores de la vía del supresor de tumores Retinoblastoma (Figura 2) y se han clasificado de diferentes maneras. Algunas de las clasificaciones se basan en su capacidad para regular la transcripción de genes específicos, en la posibilidad de formar homo o heterodímeros con alguno de los miembros de la familia de proteínas llamadas “compañeros” de dimerización (DP por sus siglas en inglés) (DP1, DP2/3 o DP 4) y, finalmente, por su propiedad de interactuar con las proteínas de la familia “pocket” p105^{RB1}, p107^{RBL1}, p130^{RBL2/RB2}^[18].

Otra clasificación más amplia y general agrupa a los factores E2F como *activadores*, los cuales reclutan complejos que ayudan a relajar la estructura de la cromatina como las HATs que contribuyen a activar genes en la fase S. Las proteínas que pertenecen a este subgrupo son los factores E2F1, 2 y 3a, cuya localización es nuclear e interactúan específicamente con Rb^[19]. Estos factores son liberados del complejo Rb-E2F cuando Rb es hiperfosforilado y, de esta manera, pueden activar a su gen blanco. Así mismo, se sabe que la sobre-expresión de cualquiera de los E2F activadores induce la entrada al ciclo celular proliferativo, mientras que su pérdida genera una disminución total de la proliferación celular^[19].

El otro subgrupo formado por los factores E2F3b, 4 y 5, poseen una función *represora*, aunque algunos autores los consideran propiamente como *activadores débiles*, un aspecto que sigue en debate. Estos factores se localizan en el citoplasma y tienen un dominio de unión a proteínas “pocket”, siendo E2F4 capaz de interactuar con todas ellas^[21]. Además reclutan enzimas modificadoras de la cromatina como las HDACs y las proteínas características de heterocromatina Suv39H1 y HP1. En contraste con los factores E2F con función activadora, la sobre-expresión de estos factores represores no correlaciona o no es suficiente para superar el arresto del ciclo celular e inducir proliferación^[19].

Un subgrupo de factores, también represores, lo conforman las proteínas E2F6, 7 y 8. Se clasifican como represores

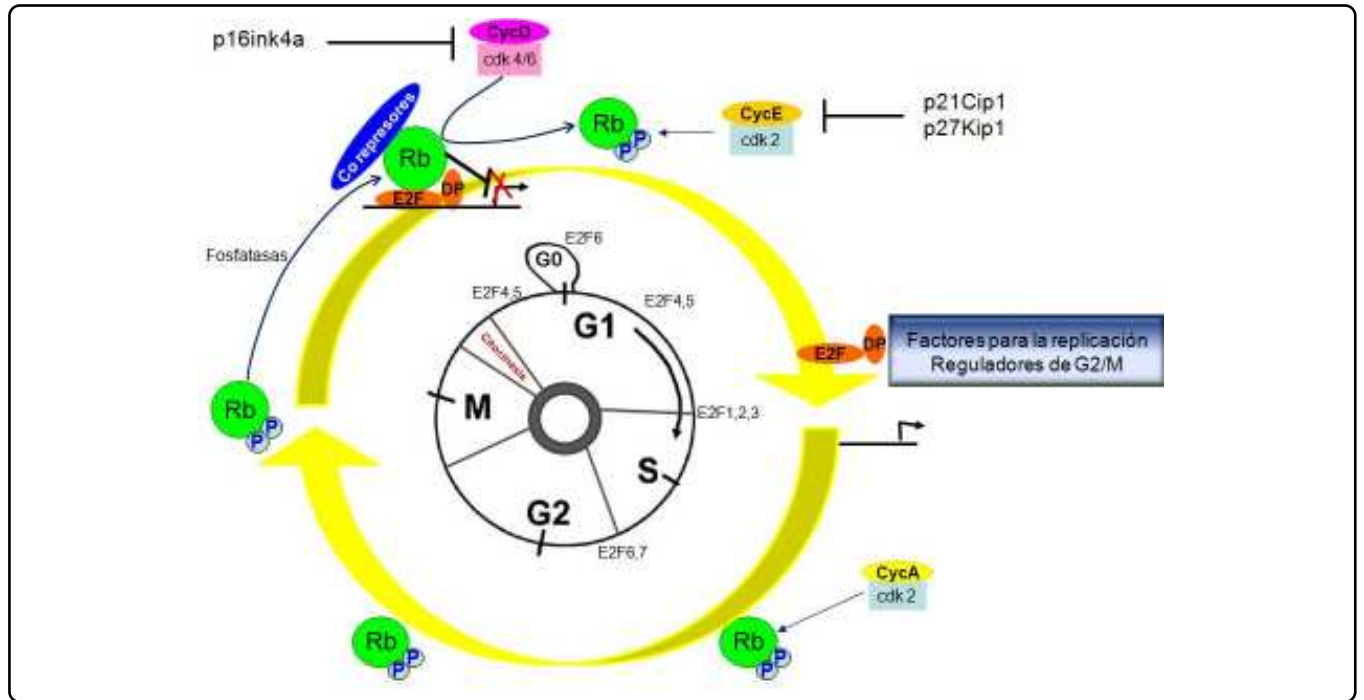


Figura 2. Esquema de la vía p16^{INK4a}/Rb en el ciclo celular y la participación de los factores E2F en cada fase. En la figura central se muestran las fases del ciclo celular y los factores E2F, tanto activadores como represores, presentes en cada fase. En la figura externa se muestra la dinámica de disociación, vía fosforilación/defosforilación del complejo Rb-E2F/DP a través de las fases del ciclo celular.

transcripcionales independientes de la interacción con proteínas “pocket”, dado que carecen de dominio de unión a este dominio peptídico (Figura 1)^[22]. El factor E2F6 ha sido relacionado con complejos proteicos que actúan en etapas específicas del ciclo celular. En particular, se ha demostrado su asociación con las proteínas represoras PcG, un aspecto que se abordará con detalle más adelante y cuya desregulación tiene que ver con el inicio y/o progresión de un proceso tumoral. Por otra parte, aunque se ha demostrado que las proteínas E2F7 y 8 se unen al mismo sitio consenso E2F, se consideran factores E2F atípicos porque en su estructura contienen dos dominios de unión a ADN y, además, esta unión es independiente de la interacción con las proteínas DP^[23,24]. De los factores E2F7 y 8 se ha acumulado poca información, sin embargo, ya se les han atribuido funciones como represores en la proliferación celular, la apoptosis, se ha descrito que se induce su expresión en respuesta al daño al ADN, incluyendo procesos carcinogénicos.

Es posible considerar y hacer la analogía de que para llevar a cabo procesos celulares, como la regulación de la expresión génica en el contexto cromatínico, existan tres niveles o jerarquías de acción, es decir, en principio estarían todas aquellas proteínas encargadas de “escribir las instrucciones”. En segunda instancia estarían las proteínas que “leerían” dichas instrucciones y las transmitirían. Es en estos dos niveles donde actuarían las proteínas represoras del grupo PcG. Finalmente, en el tercer nivel, todas las proteínas encargadas de “ejecutar o procesar” dichas instrucciones. En esta etapa estarían todas las proteínas efectoras, por ejemplo, las de la familia E2F.

LA FAMILIA DE PROTEÍNAS REPRESORAS POLYCOMB (PcG)

Cada vez hay más evidencia que sustenta la participación de las proteínas del grupo Polycomb (PcG) en la regulación transcripcional de genes implicados en la mayoría de procesos celulares importantes, tales como el control del ciclo celular, la diferenciación y el desarrollo, entre otros^[25]. Por lo que en esta sección se explicará la relevancia de esta familia de proteínas. Los genes del grupo represor PcG y del grupo activador Trithorax (trxG) codifican para co-reguladores epigenéticos antagónicos. Las proteínas PcG en un inicio se identificaron genéticamente en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, como factores requeridos para mantener la expresión correcta en tiempo y espacio de los genes homeóticos a través del desarrollo^[7]. La familia Polycomb consiste de alrededor de 20 proteínas, las cuales pueden formar distintos complejos multiprotéicos que tienen la capacidad de influir en la estructuración de la cromatina vía un arreglo de distintas actividades modificadoras de las histonas^[26,27]. Se ha demostrado que se asocian entre ellas para formar diferentes tipos de complejos represivos, de los cuales a la fecha se ha reportado que existen los que contienen a la proteína Polycomb (Pc), llamados genéricamente: complejo represor Polycomb 1 (PRC1 y PRC1-like), también conocido como complejo de mantenimiento del silenciamiento. De estos

complejos se ha predicho que en vertebrados existen al menos sesenta combinaciones posibles entre las proteínas que conforman PRC1^[28]. También existen los que contienen a la proteína Enhancer de Zeste (E(z)), llamados genéricamente complejo represor Polycomb 2 (PRC2) o complejo de inicio del silenciamiento^[29]. Algunas de las proteínas PcG de *Drosophila* tienen homólogos en humano y en otras especies que incluyen desde plantas, nemátodos, peces hasta aves. En la Tabla I se muestra un compendio de estas proteínas y algunas de sus funciones. El mecanismo de acción de estos complejos se describirá con detalle más adelante, pero de manera muy general se ha demostrado que estos complejos tienen que ser atraídos en forma secuencial a su sitio blanco. El PRC2 es el primer complejo que se recluta y el que inicia el proceso de silenciamiento marcando dicha zona genómica con la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3). Esta marca es “leída” por el complejo represor PRC1 el cual modifica la lisina 119 de la histona H2A para reforzar el silenciamiento, y además favorecer interacciones con otras proteínas represoras como HP1, DNMTs y HMTs^[30].

Además de la regulación de los genes homeóticos, se ha descrito que estas proteínas tienen diversas funciones reguladoras en el control génico de distintos organismos^[31], como en *Drosophila*^[32], mamíferos^[33] y en *Arabidopsis*^[28], donde regulan la proliferación y la diferenciación celular, la capacidad de auto-renovación de las células madre y hasta en los procesos que determinan los distintos linajes celulares. La participación de las proteínas PcG en el mantenimiento de la pluripotencialidad y de la memoria celular, se demostró generando ratones mutantes para estas proteínas y se observó que en estos animales no se formaban adecuadamente las células troncales, o bien, las células ya establecidas mostraban una fisiología y diferenciación celular deficiente^[34]. Del mismo modo, se ha demostrado que las proteínas PcG participan en el control de la transcripción, en el desarrollo, en la organogénesis, la estabilidad genética, la herencia epigenética de los programas de regulación transcripcional y en enfermedades como el cáncer^[25,35]. De hecho, existen varios reportes en la literatura donde estudian a miembros específicos de PcG tales como Bmi1, EZH2 y CBX, en los cuales se demostró que se encuentran desregulados en cáncer presentando una expresión anormal^[36-38], hecho por el que EZH2 y Bmi1 se han ganado el calificativo de oncogenes.

En *Drosophila*, se han caracterizado secuencias en el ADN responsables de reclutar *in vivo* las proteínas PcG que son conocidos como elementos de respuesta a Polycomb o PRE (por sus siglas en inglés: Polycomb Response Element). Se piensa que estos elementos tienen un papel central en el silenciamiento génico y una vez ya establecido, en el mantenimiento de éste a través de las generaciones celulares^[39]. Hasta el año 2007 no se había descrito la existencia de secuencias PRE en mamíferos o en algún otro organismo. La primera evidencia en mamíferos fue descrita por Ku y colaboradores, en 2008, quienes realizaron un

análisis de alta resolución a nivel genómico en células troncales. En este estudio se demostró que los complejos Polycomb están distribuidos generalmente en regiones de genes involucrados en el control del desarrollo. En particular se determinó que el 97% de los blancos de PcG corresponden a islas CpG o regiones ricas en CG, lo cual sugirió que podrían ser sitios de acumulación de los complejos PcG con la capacidad de funcionar como los elementos de respuesta similares a los descritos en *Drosophila*^[40]. Estas evidencias sugieren que proteínas que reconocen y se unan a regiones ricas en CpGs, pueden contribuir al reclutamiento de PcG. No obstante estas regiones carecen de una secuencia determinada que sea recurrente, lo cual podría ser útil para identificar otros candidatos como reclutadores de PcG. En suma, aún es difícil identificar regiones similares a los PREs de *Drosophila* que tengan en los mamíferos la función de reclutar a PcG a sus genes blanco, más aún, es difícil definir las condiciones en las que Polycomb es atraído a secuencias blanco específicas, ya que éstas varían de acuerdo al tipo y contexto celular^[41]. Actualmente existen únicamente tres artículos, incluyendo el de Simon y Kingston, en 2009, que mediante diferentes estrategias

experimentales han definido más claramente la posibilidad de que en mamíferos^[42] y otras especies^[43] existan estas secuencias de reclutamiento de PcG y que además participen en la regulación transcripcional de los genes blanco de PcG. En resumen, este aspecto resulta relevante dado que el definir secuencias tipo PRE pudiera permitir reconocer sitios de acción del complejo Polycomb en el genoma de diversos mamíferos.

Sin embargo, por la información existente sobre la relación entre las familias PcG y E2F, lo cual profundizaré más adelante, y por datos experimentales generados en nuestro laboratorio, sabemos que E2F6 se une al promotor del gen *Rb* y reprime su actividad [Dávalos-Salas *et al.*, datos no publicados], por tal razón, hemos pensado que E2F6 puede ser un fuerte candidato reclutador de PcG hacia sus blancos de acción, en particular, a genes supresores de tumores y contribuir de esta manera a la desregulación génica fundamental en procesos carcinogénicos.

A continuación, se describirán brevemente algunas características de las proteínas que forman cada uno de los dos

Subunidades de PcG en <i>Drosophila melanogaster</i>	Subunidades de PcG en humanos	Complejo al que pertenecen	Dominios identificados en la proteína	Funciones bioquímicas
Polycomb	CBX2(PC1), CBX4 (PC2), CBX6, CBX7 y CBX8(PC3)	PRC1	Cromodominio y dominio 'shadow'	Se une a la H3K27me3
Polyhomeotic	PH1 y PH2 BMI1, MEL18	PRC1	Dominio SAM y dedos de zinc C2-C2	Interacciones de alto orden
Posterior Sex combs	(PCGF2) y NSPC1 (PCGF1)	PRC1	Dedos RING (dedos de zinc C3HC4)	Cofactor de la enzima E3 ubiquitina ligasa y ayuda a compactar polinucleosomas
Sex combs extra	(RING) RING1 y RING1B (RNF2)	PRC1	Dedos RING (dedos de zinc C3HC4)	Enzima E3 ubiquitina ligasa de la H2AK119
Enhancer of Zeste	EZH1 y EZH2	PRC2	Dominio SET, dominio CXC y dominios de homología I y II	Histona metiltransferasa con especificidad para la H3K27
Suppressor of Zeste 12	SUZ12	PRC2	Dedos de zinc C2-H2 y dominio VEFS	Estimula a la Histona metiltransferasa con especificidad para la H3K27
Extra Sex combs and Extra Sex combs-like	EED (variantes con diferentes extremos amino-terminal)	PRC2	Repetidos WD	Estimula a la Histona metiltransferasa con especificidad para la H3K27
Nucleosome remodeling factor 55 (p55 and CAF1)	RBAP48 (RBBP4) y RBAP46 (RBBP7)	PRC2	Repetidos WD	Se une a las histonas
Polycomb-like	PHF1 (PCL1), MTF2 (PCL2) y PHF19 (PCL3)	Une a PRC2	Dos dedos PHD y un dominio Tudor	Estimula la trimetilación de H3K27 y recluta a PRC2

Tomado de Simon & Kingston^[41].

Tabla 1. Funciones de las proteínas Polycomb en *Drosophila* y humano y los complejos que forman.

complejos represores de Polycomb, esto con la finalidad de entender mejor cómo se induce la formación de cromatina inactiva o compacta.

Complejo de inicio del silenciamiento o complejo represor Polycomb 2 (PRC2)

Como se mencionó antes, el primer grupo de proteínas Polycomb, el cual inicia el proceso de silenciamiento es el complejo represor Polycomb 2 (PRC2) o complejo de inicio del silenciamiento. El PRC2 está conformado por diferentes proteínas de la familia PcG (Figura 3), sin embargo, la proteína central de este complejo es Enhancer de zeste 2 (EZH2), que es una metiltransferasa de histonas específica de lisina (HKMT), que cataliza principalmente la trimetilación de la lisina 27 (H3K27me3)^[44]. Así mismo, EZH2 también cataliza la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3) y la metilación de la lisina 26 de la histona H1 (H1K26), marcas de cromatina cerrada, aunque en menor proporción que la H3K27me3^[45].

En el complejo PRC2, además de EZH2, existen otras proteínas que forman parte del núcleo del complejo y que son esenciales para su actividad catalítica, como Supresor de Zeste 12 (SUZ12), la proteína de desarrollo del ectodermo embrionario (EED) y las proteínas de unión a histonas RBAP46/ RBAP48^[46]. Algunos de estos componentes regulan a EZH2, por ejemplo EED es una proteína que contiene un dominio repetido WD40, motivo de triptófano y aspartato que favorece la interacción proteína-proteína, de la cual existen diferentes isoformas. Cada una de estas isoformas le confieren a EZH2 especificidad por el sustrato^[47]. Así mismo, recientemente se descubrió que SUZ12 ocupa una porción importante de promotores de genes necesarios para la diferenciación de las células troncales, donde también se encontró la variante de histona H2A.Z. De esta manera, se estableció que la colocalización de las proteínas, EZH2 y SUZ12 con H2A.Z resulta en la formación de cromatina especializada

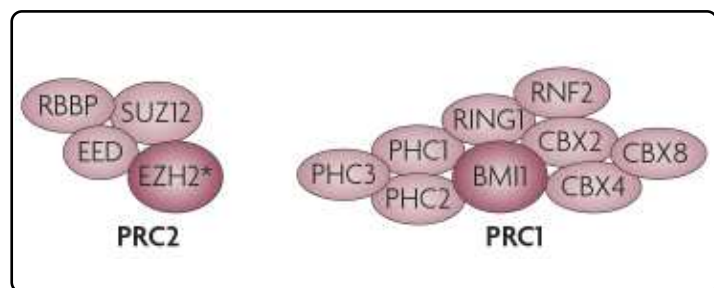


Figura 3. Representación gráfica de los componentes peptídicos que conforman a los complejos represores Polycomb. Del lado izquierdo se muestran las proteínas que conforman el núcleo del complejo represor 2. RBBP: Proteína de unión a Retinoblastoma, también conocida como NURF55 o RBAP48. SUZ12: Supresor de zeste. EED: Proteína del desarrollo embrionario del ectodermo. EZH2: "Enhancer" de zeste homólogo 2. Del lado derecho se muestran las proteínas del complejo represor 1. RNF2: Proteína 2 con dominio "ring finger". RING1: Proteína 1 con dominio "ring finger". PHC: Proteína homóloga de "polyhomeotic". CBX: Proteína homóloga "chromobox". BMI1: "BMI1 polycomb ring finger oncogene". Tomado de Mills⁴⁸.

con una señalización epigenética específica, necesaria para la ejecución apropiada de los programas de expresión durante el desarrollo^[49].

El siguiente paso en todo el proceso de silenciamiento iniciado por PcG es llevado a cabo, como se mencionó antes, por otro conjunto de proteínas de esta misma familia, el complejo de mantenimiento PRC1.

Complejo de mantenimiento o complejo represor Polycomb 1 (PRC1)

En mamífero, las cuatro subunidades que forman el núcleo de PRC1 son PHC, CBX, BMI1 y RING1 que en *Drosophila melanogaster* son los homólogos de Ph, Pc, Psc, y dRing, respectivamente (Figura 3). Así mismo, en mamíferos hay al menos cuatro parálogos de la proteína con dominio "Ring finger" Psc, que son: BMI1, Mel18, MBLR y NSPc1. Un aspecto relevante es que éstas interactúan con otras proteínas PcG para formar subtipos de complejos PRC1, por ejemplo NSPc1 y RING1B son parte del complejo represor BCOR^[50], mientras que MBLR y RING1B están relacionados con E2F6 con funciones represoras^[51]. Cabe resaltar que la importancia de que se formen diferentes sub-complejos de PcG radica en que de esta manera se asegura una diversificación de blancos de Polycomb. En la Tabla I se describen más funciones de cada una de estas proteínas.

Otra de las funciones que se le han atribuido al complejo PRC1 y sus variantes, es la actividad de monoubiquitinar la lisina 119 de la histona H2A (H2AK119Ub), una modificación relacionada con cromatina cerrada o compacta y que contribuye en el proceso de silenciamiento. Aunque existen cuatro proteínas del complejo PRC1 con dominios "Ring finger", se ha demostrado que sólo RING1A y RING1B son las que llevan a cabo la ubiquitinación de proteínas histonas^[52] y la auto-ubiquitinación para su propia regulación^[53]. También se sabe que RING1B participa en la regulación de genes que controlan la embriogénesis, el desarrollo y la inactivación del cromosoma X, donde una de las modificaciones características es la H2AK119ub1^[54,55], además existen evidencias que sugieren que esta participación puede ser vía ARNs no-codificantes^[56].

Por otra parte, datos bioquímicos sugieren que la familia de proteínas CBX, homólogos de la proteína Pc de *Drosophila*, las cuales contienen un cromodominio, son clave para la función del complejo PRC1 dado que reconocen y se unen diferencialmente a las histonas con las marcas H3K27me3 y H3K9me3. En consecuencia, esta acción contribuye a destinar a los complejos PRC1 a diferentes blancos de acción y así mantener el silenciamiento iniciado en estas regiones^[57].

Dada la relevancia de PcG y la creciente participación de los ARNs no-codificantes en la mayoría de los procesos

celulares, es importante resaltar que tanto PRC1 como PRC2 pueden interactuar con estos ARNs no-codificantes y ser dirigidos a sus sitios blanco. Recientemente se ha demostrado que SUZ12 interactúa con el ARN no-codificante llamado HOTAIR^[58] y que EZH2 interactúa a través de un dominio específico identificado recientemente llamado ncRBD1^[59]. Así mismo, se demostró que un complejo EED-EZH2 se une al ARN no-codificante Kcnq1ot1 para silenciar regiones específicas del genoma durante el desarrollo embrionario^[60].

En conclusión, resulta importante resaltar la existencia de diferentes combinaciones peptídicas de los complejos Polycomb que son atraídos a sus sitios blanco a través de diferentes factores de transcripción como las que se mencionan aquí, en particular E2F6 o incluso por ARNs no-codificantes, confiriendo al grupo PcG su especificidad y diversidad de blancos involucrados en una amplia gama de procesos celulares.

El mecanismo de acción de los complejos Polycomb

En mamíferos, a diferencia de lo que ocurre en *Drosophila*, ninguna de las proteínas del complejo PcG tiene dominio de unión al ADN, por lo que el complejo PRC2 necesita ser atraído a su sitio blanco. Existen varios estudios donde se relaciona a proteínas como el factor Yin Yang (YY1), OCT4, SOX2 y NANOG y co-factores asociados como potenciales reclutadores del complejo PcG^[61,62], sin embargo, los datos bioquímicos son insuficientes para asignarles por completo el papel de reclutadores de los complejos Polycomb. En lo particular, una asociación de PcG que ha sido mejor investigada es la que ocurre con el factor E2F6. De manera importante se ha demostrado que E2F6 puede reclutar a BMI1^[19], RING1A, RING1B^[63] y EPC1-EZH-2^[64]. Con las evidencias señaladas de que en mamíferos existen factores específicos que son capaces de atraer a PcG a sus sitios de acción, en especial con la capacidad de E2F6 de unirse a varias proteínas PcG, se puede especular sobre lo importante que es, por un lado, que un solo factor, el cual interviene en múltiples procesos y etapas celulares, sea el que dirige o determine los genes que podrían regularse. Por otra parte, no se sabe o aún no se tiene claramente definido el dominio de interacción entre E2F6 y PcG, pero es muy atractivo pensar o sugerir que PcG también pueda unirse a otros miembros de la familia E2F, dada la similitud entre todos los factores E2F (Figura 1). Lo cual ayudaría a explicar la participación temporal del grupo PcG en diversos procesos específicos durante el desarrollo. A continuación integraremos lo que se sabe de las familias E2F y Polycomb con los mecanismos más generales involucrados en la regulación del silenciamiento génico.

CONTRIBUCIÓN DE LOS MECANISMOS EPIGENÉTICOS AL SILENCIAMIENTO GÉNICO

La relación entre E2F6 y las proteínas del grupo Polycomb

El gen *E2F6* está localizado en el cromosoma 2 en la región p25.1, está constituido por nueve exones que pueden generar seis

variantes que oscilan entre 770 y 1050 pares de bases (pb) como consecuencia de diferencias en el procesamiento del ARN mensajero. La proteína E2F6 carece de los dominios homólogos amino- y carboxilo-terminal presentes en los factores E2Fs 1 al 5 (Figura 1), los cuales contienen a su vez los dominios de unión con los miembros de la familia Rb, es decir, no se une con las proteínas “pocket”, además de los dominios de transactivación o represión^[16]. Algunas de las modificaciones que se pueden presentar en la variante más común de la proteína son el cambio de ciertos aminoácidos que podrían modificar las características fisicoquímicas de la proteína, teniendo consecuencias en su papel como factor represor en la vía de p16/Rb (Figura 2), aunque esto todavía no ha sido probado experimentalmente.

Recientemente se ha demostrado que la actividad represora de E2F6 es independiente de la asociación con proteínas de la familia de Rb y que ocurre principalmente en genes regulados específicamente en la transición de fases del ciclo celular G1 a S, donde el factor E2F6 es sobre expresado. Además inhibe la entrada y salida de la fase S del ciclo celular^[65]. Este efecto, opuesto al de los otros miembros de la familia, es la manera en la cual E2F6 contribuye a la regulación adecuada del ciclo^[66] y en los procesos de diferenciación y quiescencia, reprimiendo genes específicos necesarios para el mantenimiento de la fase G₀^[19]. En un estudio donde se apoya el papel de E2F6 en la diferenciación y progresión a través del ciclo, se demostró que parte del mecanismo por el cual E2F6 funciona como represor transcripcional es debido a su asociación con PcG^[67]. Datos que apoyan lo anterior demuestran que E2F6 se encuentra co-existiendo con un complejo llamado hPRC-H que se forma específicamente en la fase G₀ del ciclo celular, asociación que se pierde en el desarrollo de un osteosarcoma^[68]. También se ha demostrado la relación con otras proteínas como supresor de variegación 3-9 homólogo 1 (Suv39H1)^[50], proteína 6 del grupo polycomb con dominio “ring finger” (PCGF6 o MBLR), factor 2 asociado a YY1 (YAF2)^[63] y metiltransferasas de histonas (HMT), aunque el mecanismo preciso y su función biológica todavía no se entiende completamente^[64,67]. Cabe resaltar que todas estas interacciones están relacionadas con el silenciamiento génico a nivel epigenético en ciertas etapas del ciclo celular. No obstante, E2F6 se expresa durante todo el ciclo, lo cual sugiere que además podría tener un papel funcional en otras etapas del ciclo celular que a la fecha no han sido investigadas^[19,50]. Por ejemplo, hay estudios que involucran a E2F6 en procesos celulares como la meiosis, donde se demostró que el motivo de unión de E2F6 está presente en la región proximal de los promotores del 79.2% de genes específicos de meiosis y que su unión contribuye en la regulación de la expresión de estos genes^[69].

En resumen, toda esta serie de evidencias a nivel epigenético muestran la relevancia del grupo PcG y su relación con el factor E2F6. A su vez, se ejemplifica como su desregulación tiene consecuencias en el desarrollo de procesos críticos de la fisiología celular. Además, existen evidencias claras de su participación en

procesos tumorigénicos, donde la proliferación celular y el control de la expresión génica están totalmente desregulados, contribuyendo así al desarrollo y progresión del cáncer.

EL GEN SUPRESOR DE TUMORES *RB* Y SU RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE CÁNCER

Además de las evidencias claras ya mencionadas del grupo PcG y el factor E2F6 con la desregulación del ciclo celular y, consecuentemente, con el desarrollo de cáncer, existe otro grupo de proteínas íntimamente ligadas al control del ciclo celular, estas son las proteínas supresoras de tumores, por ejemplo, la proteína Retinoblastoma (Rb). En particular, nos interesa resaltar el papel del gen Retinoblastoma (*Rb*), cuyo silenciamiento a nivel epigenético parece estar involucrado en el desarrollo de procesos tumorales. Por tal motivo, es necesario poner en contexto la importancia *Rb*. El gen *Rb* es uno de los genes supresores de tumores más estudiados. Está localizado en el cromosoma 13 en la posición 13q14.2, en la Figura 4 se muestra un panorama del contexto genómico en el que se encuentra *Rb*. Se sabe que las mutaciones que ocurren en el gen *Rb* son claves en el desarrollo de cáncer infantil de retina, además se ha visto que en el 90% de los casos de cánceres humanos la proteína Rb es inactiva o en casos extremos no se sintetiza^[19,70]. El hecho de identificar al gen *Rb* inactivo, llevó a describirlo como un regulador de la proliferación celular. Por otra parte, el descubrimiento de que la sobre-expresión de la proteína Rb ocasionaba que las células fueran arrestadas en la fase G1 del ciclo, mientras que las células deficientes de Rb mostraban una acelerada transición por la fase G1, apoyó fuertemente la idea de que el gen *Rb* era un inhibidor del ciclo celular^[71]. En los casos clínicos de retinoblastoma familiar, se hereda una mutación en *Rb* en la línea germinal, y los individuos afectados desarrollan tumores en la retina cuando se inactiva genéticamente el segundo alelo, lo que se considera como el paso limitante en el desarrollo de cáncer. El estudio de

muchos casos como éste, llevó a Knudson a postular la hipótesis de los “dos hits” la cual establece que se produce un primer evento “primer hit” en la línea germinal que inactiva uno de los dos alelos. Y que la pérdida del segundo alelo “segundo hit” debe ocurrir en un tejido somático para que ahí se desarrolle el tumor^[72]. Actualmente sabemos que la pérdida de cualquiera de los dos alelos se puede producir de diversas maneras, tanto por mutaciones, como por cambios epigenéticos como la metilación^[73-75].

Participación de la interacción de Rb, E2F6 y el grupo PcG en el desarrollo de cáncer

La actividad mejor conocida y más estudiada de la proteína Rb es la capacidad de reprimir la transcripción de los genes regulados por la familia de factores E2F. En la mayoría de las plantas y animales, los miembros de la familia Rb proveen un freno importante en la actividad de los factores E2F, en consecuencia, la ausencia de esta restricción coloca a las células en un estado permisivo para proliferar y preparadas para responder a señales pro-proliferativas. Las proteínas de la familia Rb bloquean la transcripción promovida por los factores E2F activadores (E2F1, 2 y 3) y activan la transcripción de aquellos blancos en complejo con los E2F represores (E2F3b, 4 y 5)^[21]. En la Figura 2 se muestra el papel de la proteína supresora de tumores Rb y de algunos componentes de la vía, lo que en el pasado explicaba que la pérdida de función, básicamente ocurría a nivel de proteína o por mutaciones de su gen. Sin embargo, ahora se sabe, y es lo que queremos resaltar en esta revisión, que la pérdida de función supresora de tumores puede ocurrir mediante acciones epigenéticas orquestadas por Polycomb, los factores E2F (en particular E2F6) y por el mismo Rb, así como por la interrelación con otros factores epigenéticos como HDACs, HMTs, DNMTs y la proteína HP1. Dos ejemplos de la actividad epigenética de la proteína Rb son: el primero, un estudio del locus p16^{INK4A} en

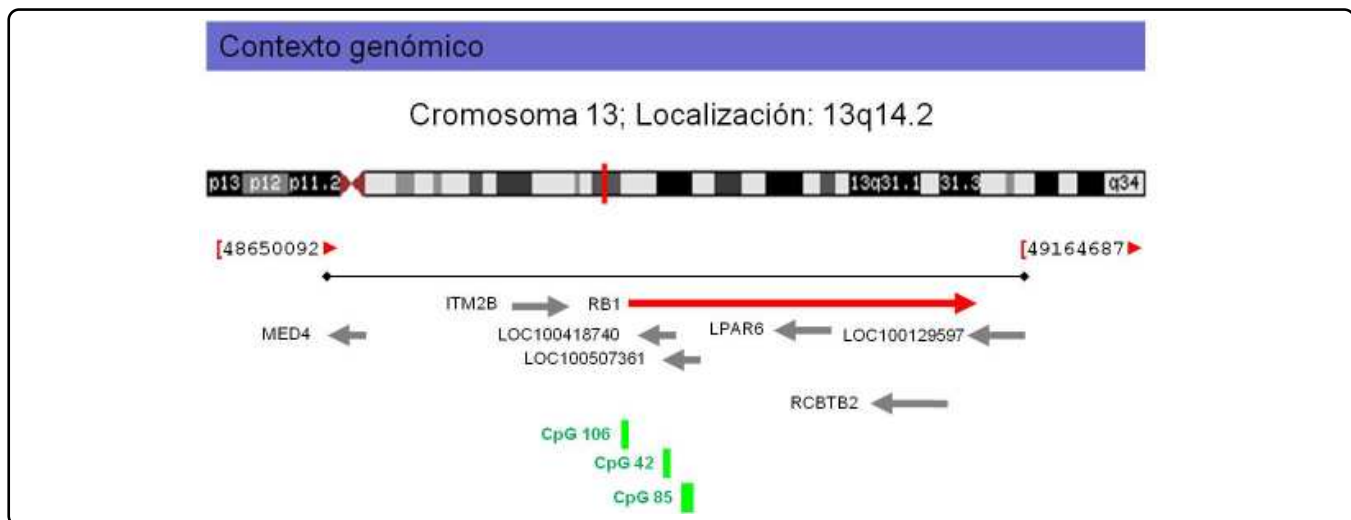


Figura 4. Paisaje genómico del gen *Rb*. Se muestra de arriba hacia abajo la localización genómica de *Rb* y genes adyacentes y las islas CpG asociadas al gen [modificado de <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>].

2007, donde se demostró que la incorporación de la marca H3K27me3 llevada a cabo por PRC2, no ocurría o disminuía en ausencia de proteínas funcionales de la familia Rb^[76]. El otro ejemplo es el descrito por Longworth donde demostró que Rb está involucrado en los procesos de compactación de la cromatina que ocurre en la mitosis, en la senescencia y la formación y/o redistribución de heterocromatina, es decir, Rb y los otros miembros de la familia participan en la formación y organización de dominios transcripcionales^[77].

Sin embargo, como se mencionó, la pérdida de función no sólo ocurre a nivel de la proteína Rb, incluso el gen *Rb* mismo, puede ser desregulado epigenéticamente, lo cual ha sido tema del interés del grupo y es actualmente una de las áreas de investigación. De hecho existen resultados que demuestran que uno de los mecanismos de regulación epigenética del promotor del gen *Rb*, es llevado a cabo por el factor CTCF^[74]. No obstante, existen otros factores que pueden contribuir a esta regulación. Basados en esta hipótesis, realizamos un análisis bioinformático de la secuencia del promotor *Rb* y se identificó un sitio de unión a factores E2F en el cual, en teoría, todos los miembros de esa familia se pueden unir. Sin embargo, sabemos por resultados experimentales, que en particular en el promotor del gen *Rb*, preferentemente E2F6, es el que se une. Así mismo, se investigó el efecto de la sobre-expresión del factor E2F6 sobre la actividad del promotor *Rb* y se encontró que ésta disminuye [Dávalos-Salas *et al.*, datos no publicados]. Integrando las evidencias experimentales que hemos descrito, es factible predecir una interrelación entre las tres familias (Figura 5). Es decir, E2F6 y PcG interactúan y se ha demostrado que esta relación tiene efectos en la expresión de genes y que, en algunos casos, además tiene consecuencias en el desarrollo de cáncer. Por otra parte, la actividad de E2F6 y *Rb* están aparentemente relacionadas, y con estas evidencias podemos postular una posible relación o interrelación Rb-E2F6-PcG, que no sólo explicaría la pérdida de función y/o actividad de *Rb*, sino de otros genes, supresores de tumores o no, que en su región promotora tenga sitios de unión a factores E2F, específicamente E2F6.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Dados los diversos procesos en los que participan los genes regulados por las proteínas de la familia E2F, resulta necesario seguir profundizando en lo relevante de su función dentro de la fisiología celular y, en particular, en la regulación del ciclo celular. La especificidad de los factores E2F por el gen blanco está dada por el subtipo de factor E2F (activador o represor) y por la unión con alguna proteína DP particular. Por otra parte, los factores E2F no clásicos (E2F6, 7 y 8), hasta ahora son los menos estudiados y en los cuales habrá que profundizar más para conocer con mejor detalle su mecanismo de acción y su participación en la represión transcripcional, dado que no interactúan con las proteínas de la familia Rb, como los E2F clásicos. Así mismo, faltan más estudios para empezar a entender la relación entre reguladores epigenéticos con familias como Polycomb y los diversos

mecanismos de silenciamiento epigenético de los genes supresores de tumores. En particular es necesario profundizar en las relaciones de E2F6 además de PcG, con otros componentes epigenéticos como los ARNs no-codificantes, los complejos remodeladores dependientes de ATP, las HDACs, HMTs y HATs, con la finalidad de enriquecer el conocimiento de sus mecanismos de acción.

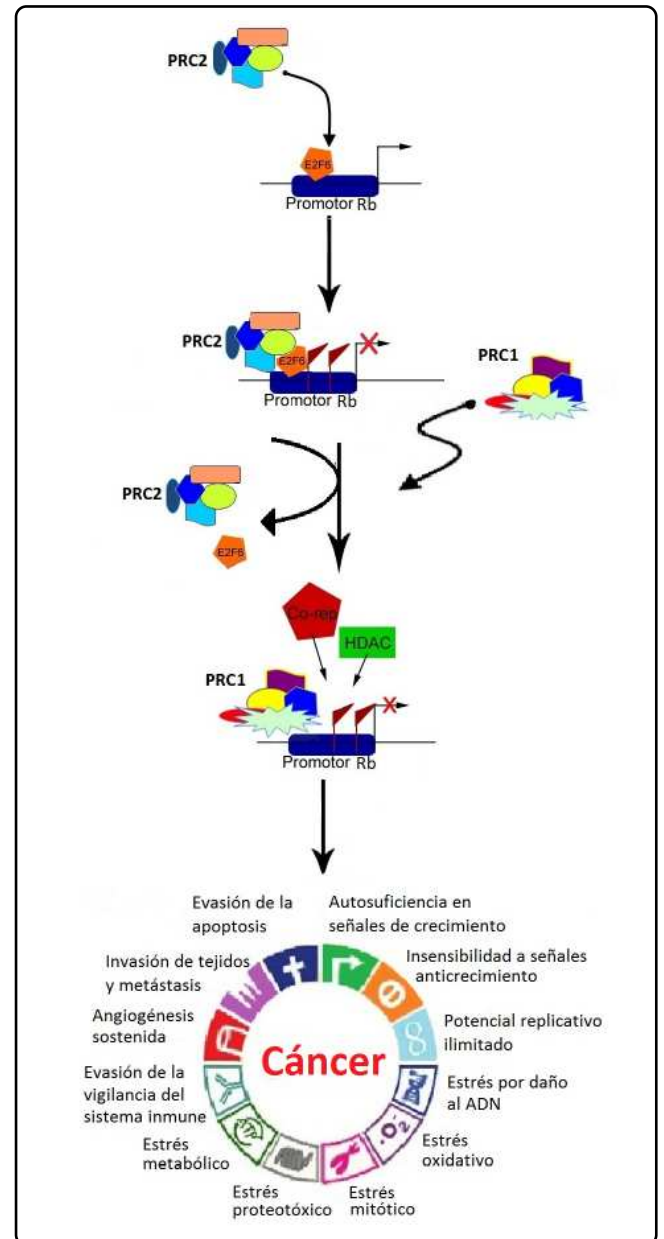


Figura 5. Modelo de un posible mecanismo de inactivación del gen supresor de tumores *Rb*. En la parte superior de la figura se muestra la participación de las proteínas PcG y E2F6 en la inactivación del promotor *Rb*. En la parte inferior de la figura se resumen los posibles cambios que ocurren en el metabolismo y fisiología celular, así como las seis capacidades que adquieren las células transformadas que al acumularse son responsables del desarrollo de tumores.

En relación al grupo Polycomb, se demostró con los ejemplos que se citan, que participa en funciones esenciales en el silenciamiento génico. Uno de los ejemplos más conocidos es la inactivación del cromosoma X. PcG también participa en la organización nuclear y la formación y mantenimiento de dominios de heterocromatina^[31,78], así como su reciente relación con los ARNs no-codificantes y su implicación en la regulación de la expresión génica^[27,79], procesos celulares cruciales que no se abordaron en esta revisión, pero que se deben tomar en cuenta. Es claro que aún queda mucho por conocer acerca de todas las funciones de esta familia de proteínas, en particular su relación con la regulación epigenética.

Respecto a Rb, además de las funciones mejor conocidas como supresor tumoral, en esta revisión se resaltan dos aspectos relativamente nuevos. Primero, la proteína Rb participa como regulador epigenético de algunos genes. Segundo, la inactivación del gen *Rb*, paso crítico en la tumorigénesis, involucra múltiples componentes epigenéticos, entre los que se incluyen las familias E2F y PcG. Aquí proponemos un posible mecanismo de cómo podría ocurrir. Sin embargo, hasta ahora sólo conocemos la punta del “iceberg”, por lo que se debe profundizar aún más en este campo del conocimiento.

En resumen, hemos tratado de sintetizar parte de la información relevante de las funciones que estas tres familias de proteínas, E2F, PcG y “pocket”, desempeñan en un proceso que, si bien no se podría categorizar como el más importante, sí se puede pensar como básico para la conservación de la homeostasis celular, y nos referimos en particular a la regulación de la expresión génica. Sobre todo, quisimos contextualizar su importancia en situaciones celulares anormales, tal como lo es el desarrollo de cáncer. Evidentemente se generan más “¿cómo?” y “¿por qué?” que eventualmente necesitarán ser contestados. Es preciso empezar a profundizar en los campos del conocimiento que recién están emergiendo, como es la participación de los ARNs no-codificantes sean pequeños y largos, en casi todos los ámbitos celulares. Por esta razón, no es difícil pensar que pueden estar relacionados no sólo con la regulación epigenética de la expresión génica, sino además ser el vínculo entre las grandes familias de reguladores epigenéticos, muy probablemente orquestando los principales procesos celulares a través de una fina red de interacciones.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Universidad Nacional Autónoma de México (IN214407y IN203811) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT: 58767 y 128464). Mercedes Dávalos Salas es becaria del CONACyT (162257) y a la Dirección General de Estudios de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México (DGEP) y al Programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM.

REFERENCIAS

1. Sherr, C.J. Principles of tumor suppression. *Cell* **116**, 235-246 (2004).
2. Luo, J., Solimini, N.L. & Elledge, S.J. Principles of cancer therapy: oncogene and nononcogene addiction. *Cell* **136**, 823-837 (2009).
3. Weinberg, R.A. Tumor suppressor genes. *Science* **254**, 1138-1146 (1991).
4. Spitale, R.C., Tsai, M.C. & Chang, H.Y. RNA templating the epigenome: Long noncoding RNAs as molecular scaffolds. *Epigenetics* **6**, 539-543 (2011).
5. Cairns, B.R. The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature* **461**, 193-198 (2009).
6. Saha, A., Wittmeyer, J. & Cairns, B.R. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **7**, 437-447 (2006).
7. Maeda, R.K. & Karch, F. The ABC of the BX-C: the bithorax complex explained. *Development* **133**, 1413-1422 (2006).
8. Sarma, K., & Reinberg, D. Histone variants meet their match. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(2), 139-149 (2005).
9. Peters, A.H., *et al.* Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol. Cell* **12**, 1577-1589 (2003).
10. Rougeulle, C., *et al.* Differential histone H3 Lys-9 and Lys-27 methylation profiles on the X chromosome. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 5475-5484 (2004).
11. Okamoto, I., Otte, A.P., Allis, C.D., Reinberg, D., & Heard, E. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* **303**, 644-649 (2004).
12. Barski, A., *et al.* High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**, 823-837 (2007).
13. Wasserman, W.W., & Sandelin, A. Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nat. Rev. Genet* **5**, 276-287 (2004).
14. DeGregori, J., & Johnson, D.G. Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr. Mol. Med.* **6**, 739-748 (2006).
15. Dimova, D.K., & Dyson, N.J. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* **24**, 2810-2826 (2005).
16. Xu, X., *et al.* A comprehensive ChIP-chip analysis of E2F1, E2F4, and E2F6 in normal and tumor cells reveals interchangeable roles of E2F family members. *Genome Res.* **17**, 1550-1561 (2007).
17. Sherr, C.J., & McCormick, F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* **2**, 103-112 (2002).
18. Polager, S., & Ginsberg, D. E2F - at the crossroads of life and death. *Trends Cell Biol* **18**, 528-535 (2008).
19. Oberley, M.J., Inman, D.R., & Farnham, P.J. E2F6 negatively regulates BRCA1 in human cancer cells without methylation of histone H3 on lysine 9. *J. Biol. Chem.* **278**, 42466-42476 (2003).
20. Di Fiore, B., *et al.* Cytosine methylation transforms an E2F site in the retinoblastoma gene promoter into a binding site for the general repressor methylcytosine-binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res.* **27**, 2852-2859 (1999).
21. Trimarchi, J.M., & Lees, J.A. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol* **3**, 11-20 (2002).
22. Storre, J., *et al.* Silencing of the meiotic genes SMC1beta and STAG3 in somatic cells by E2F6. *J. Biol. Chem.* **280**, 41380-41386 (2005).
23. Christensen, J., *et al.* Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-

- cycle regulated repressor of E2F-activated transcription, *Nucleic Acids Res.* **33**, 5458-5470 (2005).
24. Logan, N., *et al.* E2F-8: an E2F family member with a similar organization of DNA-binding domains to E2F-7. *Oncogene* **24**, 5000-5004 (2005).
 25. Schwartz, Y.B., & Pirrotta, V. Polycomb complexes and epigenetic states. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**, 266-273 (2008).
 26. Pien, S., & Grossniklaus, U. Polycomb group and trithorax group proteins in Arabidopsis, *Biochim. Biophys. Acta* **1769**, 375-382 (2007).
 27. Margueron, R., & Reinberg, D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* **469**, 343-349 (2011).
 28. Whitcomb, S.J., Basu, A., Allis, C.D., & Bernstein, E. Polycomb Group proteins: an evolutionary perspective. *Trends Genet.* **23**, 494-502 (2007).
 29. Cao, R., & Zhang, Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol. Cell* **15**, 57-67 (2004).
 30. Blomen, V.A., & Boonstra, J. Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 27-44 (2011).
 31. Lagarou, A., *et al.* dKDM2 couples histone H2A ubiquitylation to histone H3 demethylation during Polycomb group silencing. *Genes Dev.* **22**, 2799-2810 (2008).
 32. Schwartz, Y.B. *et al.* Genome-wide analysis of Polycomb targets in Drosophila melanogaster. *Nature Genet.* **38**, 700-705 (2006).
 33. Bracken, A.P., Dietrich, N., Pasini, D., Hansen, K.H., & Helin, K. Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev.* **20**, 1123-1136 (2006).
 34. Vincenz, C., & Kerppola, T.K. Different polycomb group CBX family proteins associate with distinct regions of chromatin using nonhomologous protein sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **105**, 16572-16577 (2008).
 35. Wu, J.I., Lessard, J., & Crabtree, G.R. Understanding the words of chromatin regulation. *Cell* **136**, 200-206 (2009).
 36. Honig, A., *et al.* Overexpression of polycomb protein BMI-1 in human specimens of breast, ovarian, endometrial and cervical cancer. *Anticancer Res.* **30**, 1559-1564 (2010).
 37. Suvà, M.L., *et al.* EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance. *Cancer Res.* **69**, 9211-9218 (2009).
 38. Zhang, X.W., *et al.* Oncogenic role of the chromobox protein CBX7 in gastric cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **29**, 114 (2010).
 39. Müller, J., & Verrijzer, P. Biochemical mechanisms of gene regulation by polycomb group protein complexes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**, 150-158 (2009).
 40. Ku, M., *et al.* Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet.* **4**, e1000242 (2008).
 41. Simon, J.A., & Kingston, R.E. Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 697-708 (2009).
 42. Woo, C.J., Kharchenko, P.V., Daheron, L., Park, P.J., & Kingston, R.E. A region of the human HOXD cluster that confers polycomb-group responsiveness. *Cell* **140**, 99-110 (2010).
 43. Liu, Y., Shao, Z., & Yuan, G.C. Prediction of Polycomb target genes in mouse embryonic stem cells. *Genomics* **96**, 17-26 (2010).
 44. Cao, R., *et al.* Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298**, 1039-1043 (2002).
 45. Chen, H., Tu, S.W., & Hsieh, J.T. Down-regulation of human DAB2IP gene expression mediated by polycomb Ezh2 complex and histone deacetylase in prostate cancer. *J. Biol. Chem.* **280**, 22437-22444 (2005).
 46. Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Reinberg, D. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev.* **16**, 2893-2905 (2002).
 47. Nekrasov, M., Wild, B., & Müller, J. Nucleosome binding and histone methyltransferase activity of Drosophila PRC2. *EMBO Rep.* **6**, 348-353 (2005).
 48. Mills, A.A. Throwing the cancer switch: reciprocal roles of polycomb and trithorax proteins. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 669-682 (2010).
 49. Creighton, M.P., *et al.* H2AZ Is Enriched at Polycomb Complex Target Genes in ES Cells and Is Necessary for Lineage Commitment. *Cell* **135**, 649-661 (2008).
 50. Gearhart, M.D., Corcoran, C.M., Wamstad, J.A., & Bardwell, V.J. Polycomb group and SCF ubiquitin ligases are found in a novel BCOR complex that is recruited to BCL6 targets. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 6880-6889 (2006).
 51. Ogawa, H., Ishiguro, K., Gaubatz, S., Livingston, D.M., & Nakatani, Y. A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* **296**, 1132-1136 (2002).
 52. Buchwald, G., *et al.* Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of polycomb proteins Bmi1 and Ring1b. *EMBO J.* **25**, 2465-2474 (2006).
 53. de Bie, P., Zaaroor-Regev, D., & Ciechanover, A. Regulation of the Polycomb protein RING1B ubiquitination by USP7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **400**, 389-395 (2010).
 54. de Nápoles, M., *et al.* Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev. Cell* **7**, 663-676 (2004).
 55. Schoeftner, S., *et al.* Recruitment of PRC1 function at the initiation of X inactivation independent of PRC2 and silencing. *EMBO J.* **25**, 3110-3122 (2006).
 56. Alder, O., *et al.* Ring1B and Suv39h1 delineate distinct chromatin states at bivalent genes during early mouse lineage commitment. *Development* **137**, 2483-2492 (2010).
 57. Bernstein, E., *et al.* Mouse polycomb proteins bind differentially to methylated histone H3 and RNA and are enriched in facultative heterochromatin. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2560-2569 (2006).
 58. Hung, T., & Chang, H.Y. Long noncoding RNA in genome regulation: Prospects and mechanisms. *RNA Biol.* **7**, 582-585 (2010).
 59. Kaneko, S., *et al.* Phosphorylation of the PRC2 component Ezh2 is cell cycle-regulated and up-regulates its binding to ncRNA. *Genes Dev.* **24**, 2615-2620 (2010).
 60. Wu, H.A., & Bernstein, E. Partners in imprinting: noncoding RNA and polycomb group proteins. *Dev. Cell* **15**, 637-638 (2008).
 61. Thomas, M.J., & Seto, E. Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key? *Gene* **236**, 197-208 (1999).
 62. Caretti, G., Di Padova, M., Micales, B., Lyons, G.E., & Sartorelli, V. The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.* **18**, 2627-2638 (2004).
 63. Sánchez, C., *et al.* Proteomics analysis of Ring1B/Rnf2 interactors identifies a novel complex with the Fbx110/Jhdml1B histone demethylase and the Bcl6 interacting corepressor. *Mol. Cell.*

- Proteomics* **6**, 820-834 (2007).
64. Attwooll, C., *et al.* A novel repressive E2F6 complex containing the polycomb group protein, EPC1, that interacts with EZH2 in a proliferation-specific manner. *J. Biol. Chem.* **280**, 1199-1208 (2005).
65. Giangrande, P.H., *et al.* A role for E2F6 in distinguishing G1/S- and G2/M-specific transcription. *Genes Dev.* **18**, 2941-2951 (2004).
66. Lyons, T.E., Salih, M., & Tuana, B.S. Activating E2Fs mediate transcriptional regulation of human E2F6 repressor. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **290**, C189-C199 (2006).
67. McLaughlin-Drubin, M.E., Huh, K.W., & Münger, K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with E2F6. *J. Virol.* **82**, 8695-8705 (2008).
68. Deshpande, A.M., *et al.* PHC3, a component of the hPRC-H complex, associates with E2F6 during G0 and is lost in osteosarcoma tumors. *Oncogene* **26**, 1714-1722 (2007).
69. Kehoe, S.M., *et al.* A conserved E2F6-binding element in murine meiosis-specific gene promoters. *Biol. Reprod.* **79**, 921-930 (2008).
70. Hanahan, D., & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
71. Classon, M., & Harlow, E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 910-917 (2002).
72. Knudson, A.G. Jr. Retinoblastoma: a prototypic hereditary neoplasm. *Semin. Oncol.* **5**, 57-60 (1978).
73. Macleod, K. Tumor suppressor genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 81-93 (2000).
74. DeLaRosa-Velázquez, I.A., Rincón-Arano, H., Benítez-Bribiesca, L., & Recillas-Targa, F. Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCF. *Cancer Res.* **67**, 2577-2585 (2007).
75. Dávalos-Salas, M., *et al.* Gain of DNA methylation is enhanced in the absence of CTCF at the human *retinoblastoma* gene promoter. *BMC Cancer* **11**, 232 (2011).
76. Kotake, Y., *et al.* pRB family proteins are required for H3K27 trimethylation and Polycomb repression complexes binding to and silencing p16INK4alpha tumor suppressor gene. *Genes Dev.* **21**, 49-54 (2007).
77. Longworth, M.S., & Dyson, N.J. pRb, a local chromatin organizer with global possibilities. *Chromosoma* **119**, 1-11 (2010).
78. Bantignies, F., *et al.* Polycomb-dependent regulatory contacts between distant Hox loci in *Drosophila*. *Cell* **144**, 214-226 (2011).
79. Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S.J., & Shimizu, K. MicroRNAs and Epigenetics. *FEBS J.* **278**, 1598-1609 (2011).