



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**PAPEL DE LA DESMETILASA DE HISTONAS KDM4A EN
UN MODELO DE CÁNCER**

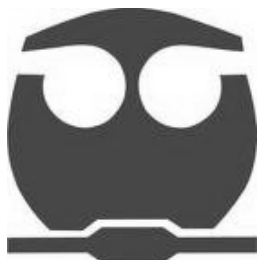
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

P R E S E N T A:

LISSANIA XIMENA GUERRA CALDERAS



México D.F.

Febrero 2014



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** María Elena Ibarra Rubio
VOCAL: **Profesor:** Euclides Avila Chávez
SECRETARIO: **Profesor:** Ernesto Soto Reyes Solís
1er. SUPLENTE: **Profesor:** Martha Patricia Coello Coutiño
2° SUPLENTE: **Profesor:** María Benita Leonor Fernández Salgado

ESTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO DE CARCINOGENESIS A CARGO DEL DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO, DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN CÁNCER DEL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA.

ASESOR DEL TEMA

Dr. ERNESTO SOTO REYES SOLÍS

SUPERVISOR TÉCNICO:

Biol. RODRIGO GONZÁLEZ BARRIOS DE LA PARRA

SUSTENTANTE:

LISSANIA XIMENA GUERRA CALDERAS

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Carcinogénesis, a cargo del Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo, de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer del Instituto de Investigaciones Biomédicas y el Instituto Nacional de Cancerología bajo la tutela del Dr. Ernesto Soto Reyes Solís, el Biol. Rodrigo González Barrios de la Parra y el Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo. Tesis apoyada por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (IN213311) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (83959 y 182997).

Los estudios de licenciatura de la alumna Lissania Ximena Guerra Calderas fueron apoyados con una beca del proyecto Básico-SEP-CONACyT-2012 número de becario 19071. Los trámites de titulación, fueron apoyados por una beca otorgada por el Programa Nacional de Becas de Educación Superior, número de folio 127583.

INDICE

1	RESUMEN.....	3
2	ANTECEDENTES	4
2.1	LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA.....	4
2.2	LAS DESMETILASAS DE HISTONAS	5
2.3	ESTRUCTURA PROTEICA DE KDM4A.....	6
2.4	FUNCIÓN DE KDM4A.....	9
2.5	EL PAPEL DE KDM4A EN EL DESARROLLO DE CÁNCER.....	10
2.5.1	Cáncer de próstata.....	10
2.5.2	Cáncer de vejiga.....	11
2.5.3	Cáncer colorrectal	11
2.5.4	Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.....	12
2.5.5	Cáncer de mama	12
2.5.6	Cáncer de pulmón	14
2.1	EL GEN <i>CHD5</i>	14
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
4	HIPÓTESIS	18
5	OBJETIVOS	18
5.1	OBJETIVO GENERAL.....	18
5.2	OBJETIVOS PARTICULARES.....	18
6	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	19
6.1	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN.....	19
6.2	INMUNOFLUORESCENCIAS.....	19
6.3	ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (ChIP).....	20
7	RESULTADOS.....	21
7.1	EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL GEN <i>KDM4A</i> EN LINEAS CELULARES DE ESTIRPE MAMARIO.....	21
7.2	ESTUDIO DE LA PRESENCIA Y LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS <i>KDM4A</i> Y <i>CHD5</i> EN LÍNEAS CELULARES NEOPLÁSICAS Y NO NEOPLÁSICAS.....	22
7.3	ANÁLISIS DE LAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS H3K36me3, H3K36me2, H3K9me3 y H3K9me2.....	25

7.4	ANÁLISIS LOCAL DE LA PRESENCIA DE KDM4A, CTCF Y LAS MODIFICACIONES H3K9me3/2 y H3K36me2 EN LA REGIÓN LOCALIZADA A +741pb EN EL GEN <i>CHD5</i>	27
8	DISCUSIÓN.....	31
9	CONCLUSIONES.....	37
10	PRESPECTIVAS	38
10.1	COMPROBAR EL ESTADO DEL PROMOTOR DE <i>CHD5</i> ASÍ COMO ANALIZAR LA EXPRESION DE ESTE GEN MEDIANTE RTq-PCR.	38
10.2	EVALUAR LA PRESENCIA Y LOCALIZACIÓN DE KDM4A EN CORTES DE TEJIDO DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA.....	38
10.3	DETERMINAR EL PAPEL DE CTCF EN EL RECLUTAMIENTO DE LA DESMETILASA DE HISTONAS KDM4A EN UN MODELO DE CÁNCER DE MAMA....	39
11	MÉTODOS EN EXTENSO.....	41
11.1	EXTRACCIÓN DE RNA	41
11.2	REACCIÓN DE TRASNCRIPTASA REVERSA PARA LA OBTENCIÓN DEL cDNA 43	
11.3	INMUNOFLUORECENCIAS (IF)	44
11.4	ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACION DE LA CROMATINA (ChIP).....	45
11.5	INMUNOHISTOQUIMICAS (IHQ).....	52
12.1	OLIGONUCLEOTIDOS EMPLEADOS	54
12.1.1	Análisis de expresión	55
12.1.2	ChIP	55
12.2	ANTICUERPOS UTILIZADOS	55
12.3	LÍNEAS CELULARES.....	56
13	REFERENCIAS	57

1 RESUMEN

La metilación de lisinas, es un componente epigenético que se asocia a apertura o cierre de la cromatina. Antes se pensaba que esta modificación era irreversible, sin embargo, se descubrieron enzimas capaces de desmetilar a las histonas, entre ellas, KDM4A, la cual remueve los grupos metilo de los residuos H3K9me3, asociado con heterocromatina, y H3K36me3, relacionado con el proceso de elongación de la transcripción por la RNA polimerasa II. La desregulación de metilación y desmetilación de histonas se encuentra involucrada en cáncer, por ejemplo, se ha observado la alteración de la expresión de *KDM4A* en cáncer de mama, sugiriendo que puede participar en esta enfermedad. El gen *CHD5* es inactivado en varios tipos de cáncer, se ha reportado que bajos niveles de expresión de *CHD5* se asocian con el desarrollo y progresión de cáncer de mama. El gen supresor de tumores, *CHD5*, es un gen blanco de KDM4A; esta desmetilasa se une a la región localizada a +741pb con respecto al sitio de inicio de la transcripción (TSS) de *CHD5*; la disociación de KDM4A provoca un aumento en la expresión de *CHD5*. Actualmente se desconoce el mecanismo por el cual KDM4A regula negativamente a *CHD5*, por lo tanto, el objetivo principal del presente trabajo fue evaluar el papel de KDM4A, la tri y dimetilación de las lisinas 9 y 36 de la histona 3, (H3K9me3/2 y H3K36me3/2) en la regulación de la expresión de *CHD5*. En nuestro estudio demostramos que los niveles de RNA mensajero de *KDM4A* aumentan en las líneas celulares cancerosas de mama MCF7, MDA-MB-231 y la línea celular derivada de cáncer cervicouterino HeLa en comparación con una línea celular no neoplásica de mama, MCF 10A. Por inmunofluorescencias (IF) se observó la presencia de la proteína KDM4A en las líneas celulares neoplásicas y no en MCF 10A; en cambio, la proteína CHD5 se encontró claramente en la línea celular MCF 10A. Estos datos sugieren una relación entre la presencia de KDM4A y la ausencia de CHD5. Mediante ensayos de ChIP se demostró la unión de KDM4A, en la región localizada a +741pb del gen *CHD5* en las líneas celulares neoplásicas, mas no en MCF 10A. La presencia de KDM4A coincide con la disminución de las modificaciones H3K36me3 y H3K9me3 y el enriquecimiento de H3K36me2 y H3K9me2. Los datos obtenidos sugieren que la unión de KDM4A a la región +741 del gen *CHD5* se asocia con el abatimiento proteico de CHD5, proponiendo que KDM4A pudiera estar implicada en la disminución de H3K36me3 involucrada en el proceso de elongación de la transcripción por la RNA polimerasa II, así como en la presencia de H3K9me3 y H3K9me2. Nuestros resultados sugieren un posible nuevo mecanismo epigenético de inactivación del gen *CHD5* donde se pudiera alterar la elongación de la RNA polimerasa II.

2 ANTECEDENTES

2.1 LA ESTRUCTURA DE LA CROMATINA

En eucariontes, el DNA está empacado en un complejo formado por proteínas y RNA conocido como la cromatina, la unidad fundamental de este complejo es el nucleosoma, el cual está conformado por aproximadamente 165 pares de bases (pb) enrolladas alrededor de un octámero de histonas (H2A, H2B, H3 y H4, un par de cada una) (Felsenfeld y Groudine 2003; Travers *et al.* 2012). La cromatina se puede estructurar en una fibra más compacta de 30 nm de diámetro conocida como solenoide el cual se encuentra estabilizado por el reclutamiento y unión de la histona H1. A este nivel se da la formación de heterocromatina por lo que se altera la expresión de múltiples genes (Luger y Hansen 2005). Las modificaciones en la arquitectura de la cromatina, son reguladas por distintos mecanismos epigenéticos, entre ellos, la metilación del DNA, los RNAs no codificantes, los remodeladores dependientes de ATP, las variantes de histonas y las modificaciones postraduccionales de las histonas. Estas últimas ocurren principalmente en el extremo amino de las histonas y promueven la relajación o compactación de la cromatina, afectando la transcripción genética. Entre estos cambios se encuentran, la ADP-ribosilación, la metilación de lisinas y argininas, la fosforilación de serinas y treoninas, la ubiquitinación y SUMOilación de lisinas y la acetilación de lisinas, por ejemplo, la acetilación de histonas es un proceso dinámico que es controlado por acetiltransferasas (HAT) y desacetilasas (HDAC); esta modificación conlleva una neutralización de cargas en las histonas lo cual provoca la relajación de la cromatina (Kouzarides 2000; Peserico y Simone 2011).

La metilación de lisinas de las histonas es otra modificación ampliamente estudiada. Esta marca epigenética puede ser reconocida por al menos 3 dominios proteicos: cromodominio, dominios tipo TUDOR y dominios WD40. Las proteínas que contienen estos dominios son reclutadas de manera específica por lisinas con distintos niveles de metilación. Principalmente las lisinas pueden presentar distinto

grado de metilación, mono, di o trimetilación (Bannister *et al.* 2002), así mismo, la unión de algunas proteínas es influenciada por las marcas epigenéticas adyacentes, sugiriendo un “código de histonas” (Rea *et al.* 2000; Lachner *et al.* 2001; Rando 2012). Un ejemplo de este código, es la interferencia de la fosforilación de la serina 10 de la histona 3 por la metilación de la lisina 9 de la misma histona (Rea *et al.* 2000).

Anteriormente se pensaba que la metilación de histonas era estable e irreversible ya que la vida media de las histonas canónicas y las histonas metiladas es muy similar (Byvoet *et al.* 1972), sin embargo, la búsqueda de proteínas que tuvieran la capacidad de desmetilar residuos de lisinas metiladas comenzó en la década de 1960 y actualmente se han caracterizado alrededor de 20 enzimas capaces de remover esta modificación covalente.

2.2 LAS DESMETILASAS DE HISTONAS

En 1964 el grupo de Paik y colaboradores reportaron una enzima que podía desmetilar lisinas mono y dimetiladas (Kim *et al.* 1964). Años más tarde el mismo grupo de investigación purificó una proteína que podía desmetilar residuos de histonas (Paik y Kim 1973, 1974). No obstante la identidad molecular de esta enzima permaneció poco clara por varias décadas.

Fue hasta el 2004 cuando el grupo de Yang Shi identificó y caracterizó la primera desmetilasa de histonas, LSD1 (Lysine specific demethylase1 por sus siglas en inglés) (Shi *et al.* 2004), después renombrada como KDM1 (Lysine demethylase 1 por sus siglas en inglés) (Allis *et al.* 2007). Esta enzima remueve el grupo metilo de las lisinas 4 y 9 de la histona 3 (H3K4me2/1, H3K9me2/1) (Shi *et al.* 2004; Metzger *et al.* 2005) mediante una reacción de oxidación, sugiriendo que KDM1 es relevante en el dinamismo de las modificaciones postraduccionales de las histonas y por lo tanto en la transcripción génica (Shi *et al.* 2004; Huang *et al.* 2006).

Actualmente, la desmetilación de las lisinas que se encuentran en las histonas es llevada a cabo por dos familias de enzimas, las amino oxidasas y las oxigenasas dependientes de Fe^{2+} y α -cetoglutarato. La primera familia lleva a cabo la desmetilación de residuos mono y dimetilados, utilizando FAD como aceptor de electrones (Shi *et al.* 2004; Anand y Marmorstein 2007). La segunda familia puede desmetilar residuos mono, di y trimetilados y utilizan como co-sustratos O_2 y α -cetoglutarato (Klose *et al.* 2006; Schneider y Shilatifard, 2006; Whetstine *et al.* 2006; Shi y Whetstine, 2007; Klose y Zhang, 2007; Hou 2010; Mosammaparast y Shi, 2010; Arrowsmith *et al.* 2012; Kooistra y Helin, 2012).

2.3 ESTRUCTURA PROTEICA DE KDM4A

La desmetilasa de histonas KDM4A, pertenece a la familia de las oxigenasas y a la subfamilia JMJD2; fue la primera enzima reportada que se une y desmetila a residuos trimetilados. KDM4A contiene un dominio Jmj-C y un dominio Jmj-N, que constituyen un sitio activo compuesto, así como dos dominios PHD y dos dominios híbridos tipo TUDOR, que forman una estructura bilobulada y cada lóbulo asemeja un dominio TUDOR normal (Figura 1A) (Couture *et al.* 2007; Patel y Wang 2013). Los dominios híbridos se estructuran por el intercambio de las cadenas β_3 y β_4 , debido a esto, el potencial electrostático es más negativo en el segundo dominio TUDOR comparado con el primero (Chen *et al.* 2006; Whetstine *et al.* 2006); como consecuencia del plegamiento de los dominios TUDOR, KDM4A se puede unir a las modificaciones H3K4me3 y H4K20me2/3, por esta razón puede reconocer regiones específicas en la cromatina (Lee *et al.* 2005; Lee *et al.* 2008; Kim *et al.* 2006). Así mismo, KDM4A desmetila los residuos trimetilados de las lisinas 9 y 36 de la histona 3 (H3K9me3 y H3K36me3) (Klose *et al.* 2006). *In vivo* KDM4A no puede desmetilar residuos dimetilados y monometilados y presenta mayor afinidad hacia H3K9me3 que H3K36me3 (Chen *et al.* 2006; Whetstine *et al.* 2006). La capacidad de KDM4A de reconocer dos regiones con secuencias distintas de aminoácidos, se puede explicar porque las interacciones entre la enzima y los

péptidos de las histonas se encuentran gobernadas por puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals e interacciones con los péptidos base de los sustratos. Además, los residuos N-terminales de H3K9me3 y H3K36me3 comparten una conformación similar y ambos péptidos se unen en la misma dirección dentro del lugar de unión al sustrato en la desmetilasa, permitiendo que la trimetil-lisina se deposite en el sitio catalítico, el cual contiene un átomo de Fe que es fundamental para la actividad catalítica de la enzima (Klose *et al.* 2006; Yamane *et al.* 2006).

El mecanismo de reacción propuesto es muy similar al que llevan a cabo las ferrohidroxilasas dependientes de α -cetoglutarato (Figura 1B) (Hausinger *et al.* 2004). El átomo de Fe activo, se encuentra en un estado de oxidación +2 y está coordinado por dos residuos de histidina, uno de glutamato y tres moléculas de H₂O [I]. Inicialmente, el α -cetoglutarato y el O₂ son coordinados en el Fe²⁺, lo que conlleva el desplazamiento de las moléculas de agua [II], después ocurre la transferencia de un solo electrón desde el Fe²⁺ hacia el O₂, generándose un radical peróxido. Este radical ataca al α -cetoglutarato y se obtiene un anhídrido mixto que está unido al Fe³⁺ -radical hidroxilo [III]; entonces el radical hidroxilo, altamente reactivo, es capaz de activar el enlace C-H del grupo metilo que se encuentra en la trimetil-lisina mediante la sustracción de un protón y la transferencia del grupo OH⁻ al átomo de carbono del grupo metilo formándose una hidróximetil-lisina [IV]. La reacción de desmetilación procede con la pérdida espontánea de formaldehído de la hidróximetil-lisina, debido a que el grupo carbonilo es un buen grupo saliente [V]. Dado que la transferencia de OH⁻ deja una brecha en la esfera de coordinación del Fe²⁺, se provoca la ruptura del anhídrido mixto que se disocia en succinato y CO₂ como subproductos, y la unión de tres moléculas de agua al Fe²⁺ regenera el sitio catalítico original (Hausinger *et al.* 2004).

Debido a la actividad catalítica de KDM4A, su estructura y capacidad de reconocer regiones específicas en la cromatina, se han asociado diversas funciones a esta proteína, algunas de las cuales se describen a continuación.

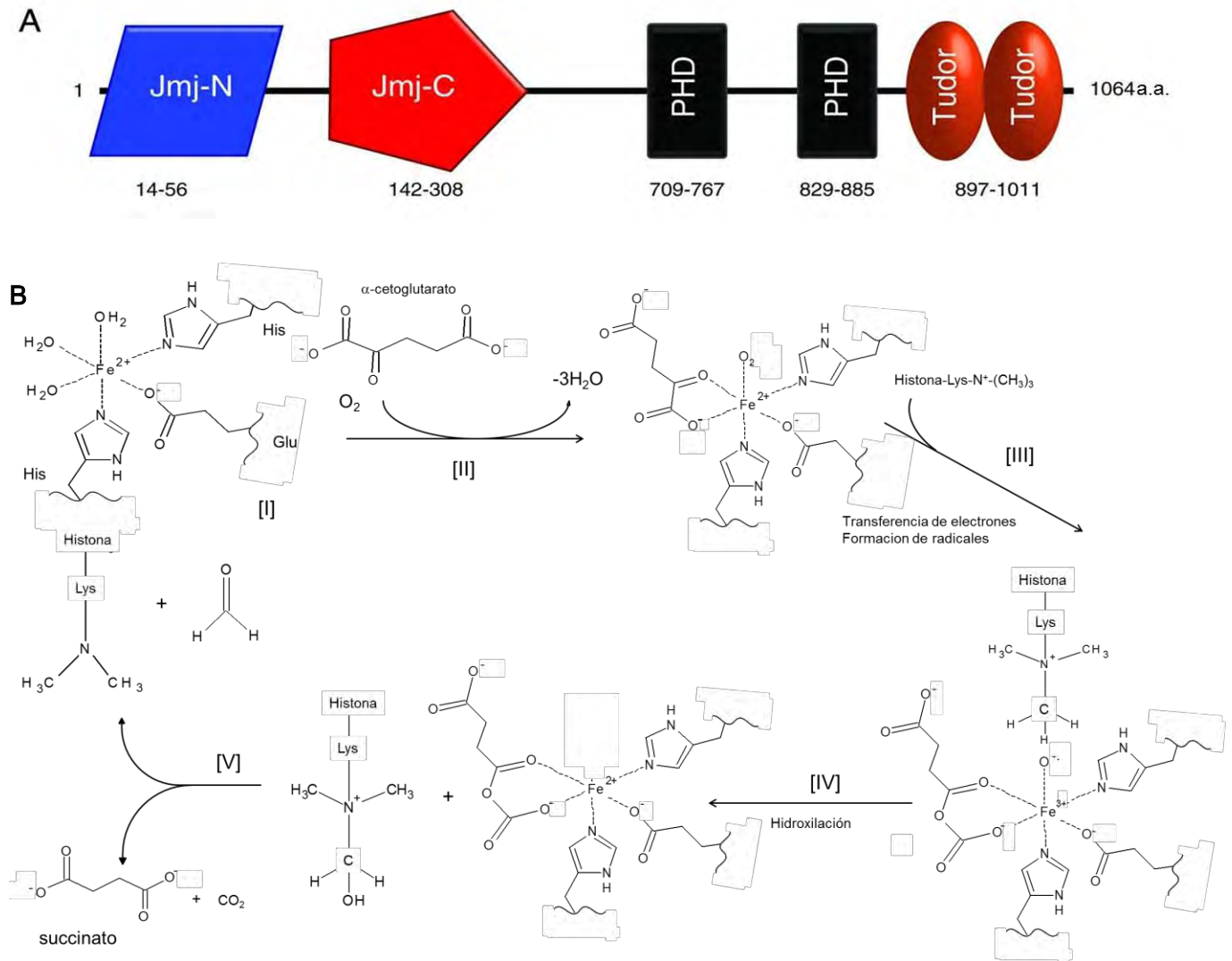


Figura 1. Estructura y mecanismo de la desmetilasa de histonas KDM4A. (A) La proteína KDM4A consiste en 1064 aminoácidos (a.a.), los cuales se organizan en diferentes dominios, un dominio Jmj-N (en azul) abarca de los a.a 14 al 56, un dominio Jmj-C (en rojo) el cual ocupa los a.a 142-308, dos dominios PHD (en negro) los cuales abarcan del a.a 709 al 767 y del a.a 829 al 885, y dos dominios híbridos tipo TUDOR, los cuales ocupan los a.a 897-1011. (B) El mecanismo de reacción propuesto es muy similar al que llevan a cabo las ferro-hidroxilasas dependientes de α -cetoglutarato, se puede dividir en 5 pasos, primeramente el átomo de Fe se encuentra coordinado por dos residuos de histidina, uno de glutamina y 3 moléculas de agua, posteriormente se activa el Fe mediante la coordinación del α -cetoglutarato y O_2 (II), a continuación se transfiere un electrón del Fe^{2+} al O_2 y se forma un radical (III), después, la trimetil-lisina es atacada por este radical resultando en la hidroxilación de un grupo metilo (IV), después, se pierde espontáneamente el grupo carbonilo (V), finalmente se regenera el sitio catalítico de la enzima mediante la coordinación de 3 moléculas de H_2O al ion Fe^{2+} (Hausinger *et al.* 2004). Las estructuras fueron elaboradas con el programa ChemSketch.Ink de ACDLABS FREEWARE.

2.4 FUNCIÓN DE KDM4A

Esta enzima es importante en la replicación celular y en la estabilidad genómica. La sobreexpresión de *KDM4A* en células humanas, se asocia con un relajamiento de la estructura de la cromatina, lo que causa que el paso por la fase S sea más rápido; por el contrario la mutación de la proteína ortóloga en *Caenorhabditis elegans* conlleva al aumento del tiempo de replicación y del daño al DNA, el cual induce a la muerte celular programada dependiente de p53 (Black *et al.* 2010). Los niveles de la proteína KDM4A son dependiente del ciclo celular, así mismo, KDM4A antagoniza con las funciones de la proteína de heterocromatina 1 gamma (HP1 γ) (Black *et al.* 2010), estos resultados sugieren un modelo en el KDM4A regula la replicación del DNA controlando la accesibilidad de la cromatina (Black *et al.* 2010).

En *C. elegans*, KDM4A está involucrada en la disminución de H3K36me3 en el cromosoma X, sugiriendo que esta proteína es importante en el desarrollo de células germinales (Reinke *et al.* 2000; Kelly *et al.* 2002; Reuben y Lin 2002).

También se sabe que KDM4A se encuentra involucrada en la represión del gen *Achaete-Scute Complex Homolog 2 (ASCL2)*, ya que actúa como co-factor del co-represor N-CoR, para lo cual requiere de su actividad de desmetilasa (Zhang *et al.* 2005; Klose *et al.* 2006). Por otro lado, KDM4A también se asocia con desacetilasas de histonas y la proteína de retinoblastoma, pRb, para reprimir los promotores regulados por E2F, pero en este caso el papel de esta proteína como desmetilasa no ha sido estudiado (Gray *et al.* 2005). Mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), se encontró que la mayoría de los genes regulados por KDM4A de *Drosophila melanogaster* (dKDM4A), no presentan cambios en las marcas de H3K36me3 y H3K9me3, además, en algunos casos, los genes afectados por esta enzima, se encuentran cercanos, sugiriendo que gran parte de los genes controlados por dKDM4A no son regulados por los niveles de H3K36me3 y H3K9me3, y que otras funciones que dependen de dKDM4A están involucradas (Crona *et al.* 2013). Una probable explicación de los

cambios encontrados en las mutantes, podría ser la interacción con otras proteínas como, pRb (Gray *et al.* 2005) y el represor N-CoR (Zhang *et al.* 2005).

Así mismo, KDM4A coactiva el gen *NANOG* en células troncales (Agger *et al.* 2007; Lan *et al.* 2007 y Loh *et al.* 2007), y la isoforma Δ N-KDM4A lleva a cabo la desmetilación de H3K9me3 del promotor del gen *Myog*, durante la diferenciación del músculo esquelético de mioblastos a miotubos (Verrier *et al.* 2011).

Estos datos indican que KDM4A tiene un papel importante en desarrollo de células madre y sugieren que la expresión de *KDM4A* en células diferenciadas puede contribuir a la modificación de la arquitectura de la cromatina, la cual se encuentra alterada local y globalmente en el cáncer. Se ha sugerido que los patrones de expresión de *KDM4A* se ven alterados en varios tipos de neoplasias (Cloos *et al.* 2008; Jovanovic *et al.* 2010).

2.5 EL PAPEL DE KDM4A EN EL DESARROLLO DE CÁNCER.

2.5.1 Cáncer de próstata

En el 2007 se determinó que *KDM4A* se encuentra sobreexpresado en cáncer de próstata, además la proteína KDM4A funciona como un co-activador del receptor de andrógenos (RA) y en condiciones que simulan niveles bajos de ligandos del RA, KDM4A puede activar la transcripción basal del antígeno específico prostático (PSA, por sus siglas en inglés de Prostate specific antigen), estos resultados sugieren que la sobreexpresión de *KDM4A* puede ser una causa de que los tumores de próstata se vuelvan refractarios a la terapia de abatimiento de andrógenos (Shin y Janknecht 2007).

2.5.2 Cáncer de vejiga.

Contrario a lo observado en cáncer de próstata, los niveles de KDM4A y KDM1 en cáncer de vejiga son bajos con relación a tejido normal y su regulación no depende del receptor de andrógenos (Kauffman *et al.* 2011). La pérdida de KDM4A y RA en tumores primarios y avanzados sugiere que estas proteínas no son necesarias para la iniciación y/o progresión de la enfermedad y hace suponer que tengan un papel potencial en retardar la carcinogénesis, sin embargo, el significado fisiológico de los bajos niveles del RA y de KDM4A con respecto a la señalización de andrógenos se desconoce (Kauffman *et al.* 2011). Por otra parte, la pérdida de KDM4A correlaciona con un mal pronóstico, lo que sugiere evidencia para emplear a esta desmetilasa como un nuevo biomarcador para la estratificación del riesgo de los pacientes con cáncer de vejiga (Kauffman *et al.* 2011).

2.5.3 Cáncer colorrectal

En el 2012, Kim y colaboradores demostraron mediante ChIP que las proteínas KDM4A y p53 son reclutadas al promotor de *p21*, después de la estimular células derivadas de cáncer de colon con doxorrubicina, agente que ocasiona daño al DNA (Kim *et al.* 2012).

Por otra parte, la disminución de KDM4A, mediada por siRNAs conllevó al aumento de p21 y a la proteína pro-apoptótica Puma, induciendo la apoptosis de las células HCT116 de cáncer colorectal, este decremento también derivó en la disminución de la proliferación en diversas líneas celulares cancerosas de colon, mientras que la expresión exógena de *KDM4A* aumento la proliferación de HCT116 en medio con baja concentración de suero (Kim *et al.* 2012). Estos hallazgos indican que KDM4A promueve la proliferación y sobrevivencia de las células derivadas de cáncer de colon (Kim *et al.* 2012).

2.5.4 Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello

El factor de transcripción AP1 (Activating Protein 1, por sus siglas en inglés), juega un papel importante en el desarrollo de tumores y metástasis, este factor está compuesto por dos proteínas, entre las que destacan c-Jun y c-Fos, la formación de AP1 puede estar mediada por la transcripción de los genes *JUN* y *FOS*, así mismo, estos genes regulan su propia expresión mediante sitios de unión a AP1 en sus promotores, promoviendo así la formación de AP1, en una cascada de retroalimentación positiva (Angel *et al.* 1988; Ozanne *et al.* 2000; López-Bergami *et al.* 2010).

Un estudio realizado en 2013, analiza líneas celulares derivadas de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, demostró que la activación transcripcional *JUN* y *FOS* es mediada por la desmetilación de la marca represiva de histonas H3K9me3, la cual es llevada a cabo por KDM4A (Ding *et al.* 2013). Este mismo estudio mostro que la proteína AP1 no es capaz de unirse a las regiones promotoras de JUN y FOS que contienen la marca H3K9me3 (Ding *et al.* 2013). Adicionalmente, la abundancia de la desmetilasa correlaciona con la cantidad de las proteínas c-Jun y c-Fos. En conjunto, estos resultados sugieren que KDM4A puede estar involucrada en los procesos de invasión y metástasis del carcinoma de células escamosas (Ding *et al.* 2013).

2.5.5 Cáncer de mama

Se ha mostrado una sobreexpresión de *KDM4A* en tumores triple negativo, este aumento se asocia con la pérdida de la marca de histonas H3K9me3, la cual de manera normal esta enriquecida en la región pericentromérica. Slee y colaboradores demostraron que la pérdida de H3K9me3 en los cromosomas 5 y 7 puede contribuir al desarrollo de aneuploidías e inestabilidad cromosómica (Slee *et al.* 2012), no obstante, pueden existir causas diferentes del aumento de KDM4A, que pudieran originar inestabilidad cromosómica debido a la falta de

H3K9me3, tales como la disminución de la expresión de las metiltransferasas SUV39H1/2 que incorporan dicha marca (Peters *et al.* 2001), o complejos que ayudan a la correcta segregación cromosómica y a la supresión tumoral como son pRb (Gonzalo *et al.* 2005), SWI/SNF (Bourgo *et al.* 2009) y mSds3 (David *et al.* 2003; David *et al.* 2006).

Otros estudios han comparado tejido canceroso de mama y mama no neoplásica, donde se observaron diferencias significativas en la abundancia de proteínas que modifican las histonas, entre ellas KDM4A; estas diferencias se asocian con parámetros patológicos y clínicos, sin embargo, se requieren más estudios para determinar el significado biológico y clínico de las diferentes combinaciones en los perfiles de expresión (Patani *et al.* 2011).

En 2012 Li y colaboradores demostraron que el abatimiento de KDM4A mediante la transfección de siRNAs en líneas celulares derivadas de cáncer de mama, reduce la proliferación, invasión y migración, no obstante, el papel de KDM4A en el desarrollo de cáncer de mama, aún no está claro (Li *et al.* 2011; 2012).

Otro estudio propone que KDM4A funciona como un coactivador del receptor de estrógenos (RE) debido a que forman un complejo, KDM4A-RE, la sobreexpresión de KDM4A deriva en un incremento de la transcripción dependiente de estrógenos, mientras que su abatimiento causa una disminución transcripcional de los genes blanco del RE, entre ellos la *CCND1* (gen que codifica para la ciclina D1), el cual se ve aumentado en cáncer de mama (Altucci *et al.* 1996; Cicatiello *et al.* 2004). De manera interesante, la expresión de *c-JUN* es independiente de señalización hormonal y también se ve disminuida después del abatimiento de KDM4A. La proteína c-Jun tiene funciones importantes en tejidos neoplásicos, su sobreexpresión estimula la invasión, migración y la formación de tumores y su inactivación causa el arresto del ciclo celular (Berry *et al.* 2012). En conjunto, estos datos sugieren que KDM4A puede coactivar genes tanto dependientes como independientes del RE, y que puede estar regulando el crecimiento y proliferación

de las células de cáncer de mama promoviendo la expresión de al menos dos oncogenes, *c-JUN* y *CCND1* (Berry *et al.* 2012).

2.5.6 Cáncer de pulmón

Recientemente, se han llevado a cabo estudios sobre KDM4A en cáncer de pulmón, entre ellos, dos reportes independientes observaron la presencia nuclear de KDM4A en tejidos neoplásicos, como carcinomas pulmonares y carcinomas de células no pequeñas NSCLC (Non-Small Cell Lung Carcinoma, por sus siglas en inglés), mientras que no se detectó KDM4A en tejido de pulmón normal (Mallette y Richard 2012; Kogure *et al.* 2013). De manera interesante, no se encontró relación alguna entre la expresión de KDM4A y el pronóstico de los pacientes (Kogure *et al.* 2013). Estos datos sugieren que la sobreexpresión de KDM4A en NSCLC puede considerarse un evento temprano en la carcinogénesis de este tipo de tumores (Kogure *et al.* 2013).

En el 2012, Mallette y colaboradores observaron que *KDM4A* se sobreexpresa en líneas celulares cancerosas de pulmón de ratón y humano, y también que el abatimiento de KDM4A en la línea celular de cáncer A549 dispara la senescencia (Mallette y Richard 2012). Esta desmetilasa parece estar implicada en la regulación del gen supresor de tumores *CHD5*, el cual se encuentra implicado en la ruta de ubiquitinación p53 (Bagchi 2007 y Serrano 1997). Los resultados obtenidos por este grupo de investigación proponen que el aumento de los niveles de KDM4A en cáncer de pulmón, podría estar cooperando con otros factores para promover la transformación de celular, bloqueando la senescencia dependiente de p53 vía *CHD5* (Mallette y Richard 2012).

2.1 EI GEN *CHD5*

El gen *CHD5* está localizado en el cromosoma 1 en el *locus* 1p36.31, *CHD5* presenta un promotor que se encuentra embebido en una isla CpG clasificada como alta, ya que presenta una densidad de 180 CpGs en dicha región (Figura

2A). *CHD5* codifica para una enzima que pertenece a la familia de las helicasas (chromodomain helicase DNA-binding protein 5, por sus siglas en inglés) (Thompson *et al.* 2003), la proteína CHD5 está conformada por dos dominios PHD, dos cromodominios, un dominio con actividad de helicasa y un dominio de unión a DNA, el cual se encuentra conservado en la familia (Figura 2B) (Thompson *et al.* 2003).

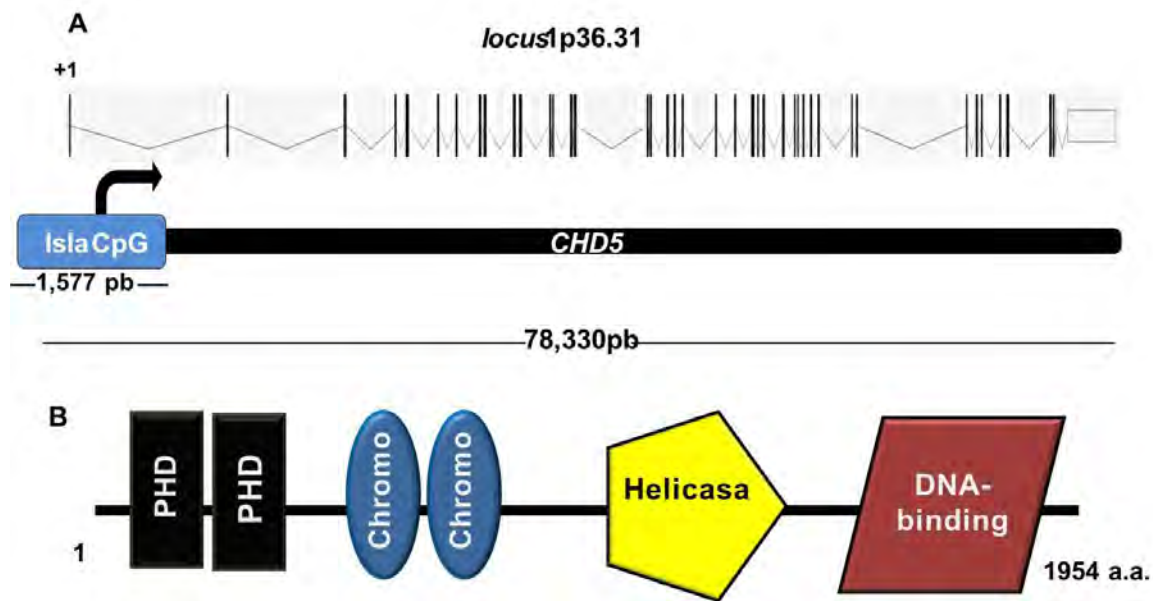


Figura 2. Estructura del gen y de la proteína CHD5 (A) El gen *CHD5*, se encuentra en el locus 1p36.31, su promotor se encuentra embebido en una la isla CpG de 1577 pb con 180 sitios CpGs, (B) La proteína CHD5 consiste en 1954 aminoácidos los cuales están organizados en dos dominios tipo PHD, dos cromodominios, un dominio con actividad de helicasa y un dominio de unión a DNA (Thompson *et al.* 2003).

Se sabe que la proteína CHD5, tiene función como supresora de tumores, ya que controla la proliferación, apoptosis y senescencia celular por la vía de $p19^{Arf}$ / $p53$ (Bagchi 2007 y Serrano 1997). CHD5 regula de manera positiva a $p19^{Arf}$, que codifica para una proteína que secuestra a Mdm2 (Murine doble minute 2), la cual se encarga de ubiquitinar a $p53$, para su posterior degradación. La deficiencia de $p19^{Arf}$ y de CHD5 compromete a $p53$ y sus funciones de supresor de tumores tales como la inducción de senescencia (Bagchi 2007 y Serrano 1997).

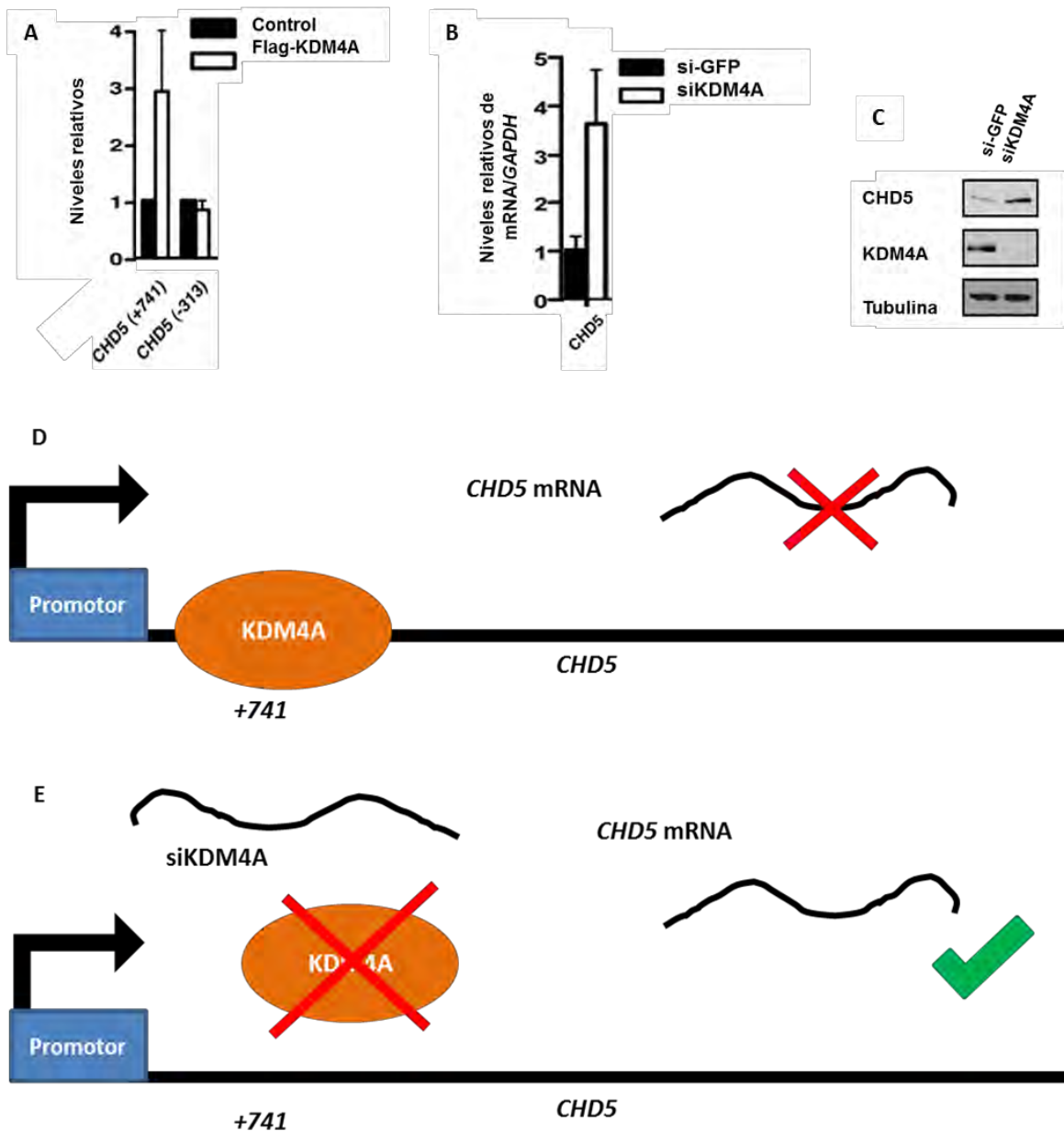
CHD5 se encuentra inactivado en varios tipos de neoplasias, como el cáncer de mama (Wu *et al.* 2012). Hasta ahora se han encontrado 2 mecanismos de inactivación del gen *CHD5*: el primero es por un proceso genético donde se ha reportado la delección del gen en neuroblastomas, y el segundo mecanismo conocido es la hipermetilación del promotor, la cual se presenta en gliomas y cáncer colorrectal (Mulero-Navarro y Esteller 2008). En el caso de cáncer de mama, se ha detectado que la hipermetilación del promotor de esta helicasa es específica de tumor y que bajos niveles de *CHD5* se relacionan con el desarrollo y progresión de este tipo de neoplasia (Mulero-Navarro y Esteller 2008).

En el 2012 por medio de ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina y microarreglos (técnica conocida como ChIP-on-ChIP), se identificó a *CHD5* como un blanco génico de *KDM4A*. En este estudio se observó que *KDM4A* se une a la región localizada a +741pb con respecto al TSS de dicho gen (Figura 3A) (Malette y Richard 2012). La expresión de *KDM4A* conduce a una reducción del transcrito y la proteína de *CHD5*, por el contrario, el abatimiento de *KDM4A* en la línea celular de pulmón A549 aumenta los niveles de *CHD5* y desencadena la senescencia (Figuras 3B, 3C, 3D, 3E) (Malette y Richard 2012).

Estos hallazgos sugieren que la regulación negativa del gen *CHD5* está dada por otros mecanismos diferentes a la metilación del promotor y la delección del gen.

Uno de estos procesos alternos, pudiera estar mediado por la pérdida de H3K36me3, esta modificación postraduccional es llevada a cabo por la enzima Set2 y se encuentra asociada con el proceso de elongación de la transcripción por RNA polimerasa II (Li *et al.* 2007; Vavouri y Lehner 2012). Se ha reportado que la presencia de H3K36me3 en el cuerpo del gen, correlaciona con altos niveles de transcripción mientras que H3K36me2 en el cuerpo del gen se relaciona con niveles bajos de transcripción (Li *et al.* 2007; Vavouri y Lehner 2012).

Debido a las implicaciones de la pérdida de la modificación H3K36me3, en este trabajo se propone estudiar a un nuevo mecanismo de inactivación genética donde la pérdida de H3K36me3, mediada por *KDM4A*, en el cuerpo del gen *CHD5* altera la elongación de la transcripción mediada por la RNA polimerasa II.



0

Figura 3: Papel de KDM4A en la regulación del gen *CHD5*. (A) Inmunoprecipitación de la Cromatina evaluada por PCR cuantitativo (qPCR) donde se observa que KDM4A se une a la región +741 del gen *CHD5*, (B) Determinación de la expresión del gen *CHD5*, qPCR en el cual se demuestra que el abatimiento de KDM4A conlleva a un aumento de la expresión de este gen, (C) Determinación de la abundancia de las proteínas por Western blot, se muestra la presencia de CHD5 y KDM4A, tras la transfección de siGFP y siKDM4A (Modificado de Mallette y Richard 2012). (D) Esquema de la unión y efecto de KDM4A en el gen *CHD5*, se muestra que KDM4A tiene un efecto negativo en la transcripción del gen *CHD5*, y (E) Esquema de la unión y efecto de KDM4A en el gen *CHD5*, después del abatimiento de KDM4A mediante un RNA de interferencia, se observa que *CHD5* es transcrito.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿La desmetilación de H3K36me3 en la región localizada a +741pb en el gen *CHD5*, por KDM4A, podría repercutir en su expresión?

4 HIPÓTESIS

La pérdida de H3K36me3 por KDM4A, conlleva a una disminución de la expresión del gen *CHD5*.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el papel de la desmetilasa de histona KDM4A y las modificaciones H3K9me3/2 y H3K36me3/2 en la regulación de la expresión del gen *CHD5*.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el patrón de expresión de *KDM4A* en líneas celulares derivadas de cáncer de mama así como líneas celulares no cancerosas.
2. Evaluar la presencia y localización de KDM4A y *CHD5* en modelos celulares de mama.
3. Determinar la presencia de H3K36me2/3 y H3K9me3/2, en líneas celulares no neoplásicas y neoplásicas.
4. Evaluar las modificaciones postraduccionales de las histonas, H3K36me2/3 y H3K9me3/2, así como la presencia de KDM4A en la región localizada a +741 pb en gen *CHD5*, en líneas celulares neoplásicas y no neoplásicas.

6 DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 ANÁLISIS DE EXPRESIÓN

Se extrajo RNA total de las distintas líneas celulares por el método de Trizol® (Invitrogen cat. 1559602), y se cuantificó y determinó la integridad mediante un gel de agarosa. Se obtuvo el cDNA con el Kit GeneAmp® RNA PCR KIT, empleando un microgramo de RNA y siguiendo las especificaciones del fabricante, ver sección 11.2.

Las reacciones de PCR en tiempo real (qPCR), se llevaron a cabo por triplicado experimental en una placa de 96 pozos utilizando SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas ® cat. K0222) en el termociclador Step One Plus de Applied Biosystems. Los resultados se analizaron con el método de doble Δ CT, (Livak y Schmittgen 2001), se empleó a GAPDH como gen de expresión constitutiva y los datos se normalizaron con respecto a la línea celular no neoplásica MCF 10A.

6.2 INMUNOFLUORESCENCIAS

Se cultivaron distintas células en cubreobjetos de 22x22 mm, posteriormente se fijaron las interacciones celulares con formaldehído al 1%. Seguido de esto se realizan 3 lavados con PBS de 3 minutos cada uno, se permeabilizaron las células con tritón X-100 al 0.1% durante 5 minutos, a continuación se realizan lavados con PBS. Las células fueron bloqueadas con glicina 100 mM por una hora. Posteriormente se incubaron los distintos anticuerpos primarios durante una hora en una cámara húmeda (Los anticuerpos empleados y su dilución se indican en la sección 12.2). Se realizaron 3 lavados con PBS y se incorporó el anticuerpo secundario, previamente diluido (1:200), durante una hora en cámara húmeda

aislada de la luz. Por último se realizaron 3 lavados de PBS y las muestras se montaron con medio de montaje Vecta Shlied con DAPI. Los controles negativos son únicamente los anticuerpos secundarios con el fin de determinar el fondo de los mismos.

6.3 ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (ChIP)

Para realizar los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina se siguieron las especificaciones que indica el Kit **OneDay ChIP kit**, (Diagenode ® Cat. kch-oneDIP-060 / kch-oneDIP-180) también se usaron anticuerpos que se indican en la sección 12.2. Los ChIPs se evaluaron por PCR en tiempo real el análisis de datos se llevó a cabo como se indica en la sección 11.4, los resultados se muestran en veces de enriquecimiento de las inmunoprecipitaciones con respecto al anticuerpo inespecífico, IgG. Para consultar la metodología detalladamente ver la sección 11.

7 RESULTADOS

7.1 EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL GEN *KDM4A* EN LINEAS CELULARES DE ESTIRPE MAMARIO.

Con el fin de conocer los niveles de expresión del gen *KDM4A*, se realizó una retrotranscripción y PCR cuantitativa (RT-qPCR) en las líneas celulares neoplásicas de mama MCF7 y MDA-MB-231. Como control positivo se empleó la línea celular HeLa la cual previamente se ha reportado que sobreexpresa al gen *KDM4A* (Zhang *et al.* 2005). Se utilizó a *GAPDH* como control interno y normalizamos con respecto a la línea celular no neoplásica MCF 10A. Los resultados mostraron que las líneas celulares MCF7 y MDA-MB-231 presentan un incremento significativo de 10.77 ± 1.38 y 54 ± 11.55 veces, respectivamente, en la expresión *KDM4A* comparándolas con MCF 10A. A su vez se observa que la línea derivada de cáncer cervico-uterino, HeLa, mostró una expresión 5.63 ± 1.18 veces mayor en comparación con la línea MCF 10A (Figura 4). Estos resultados sugieren que el gen *KDM4A* se sobreexpresa en líneas celulares de cáncer de mama mientras que en MCF 10A no observamos este fenómeno.

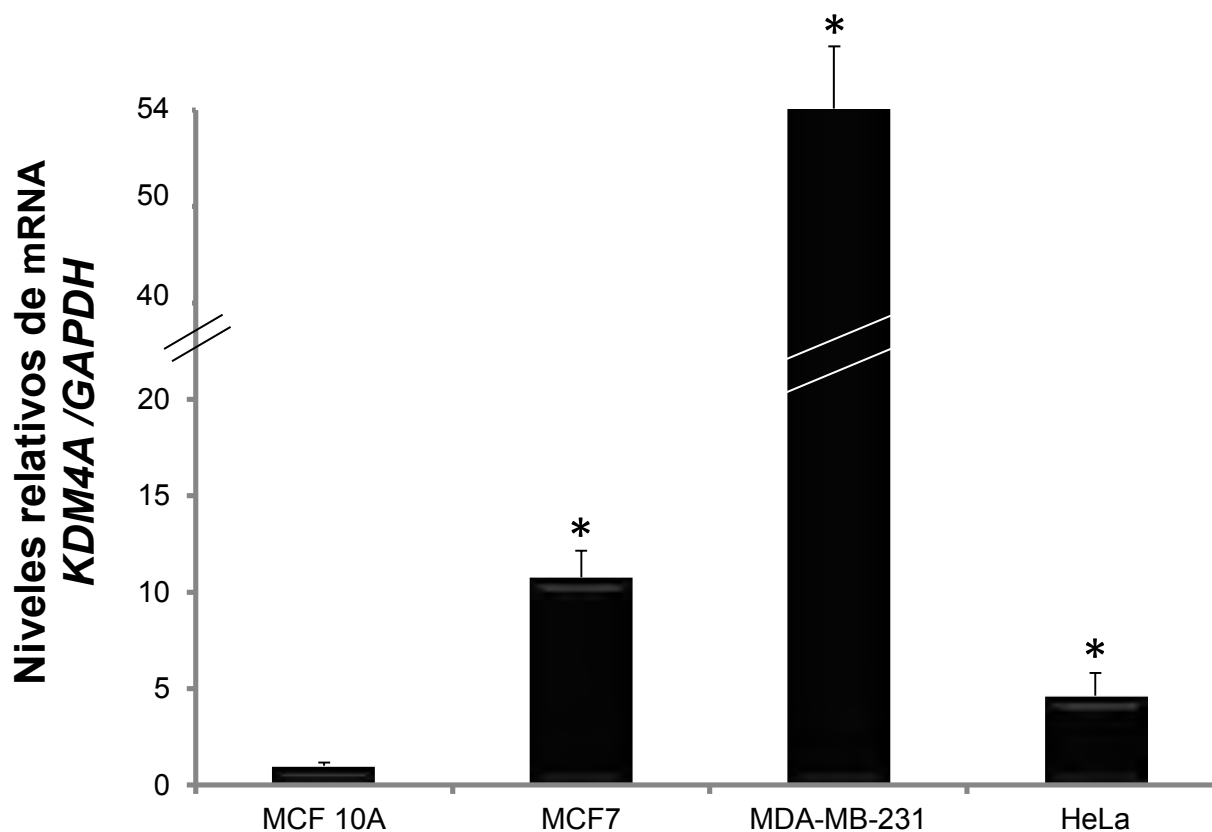


Figura 4. Evaluación de los niveles de expresión por medio de RT-qPCR del gen *KDM4A*, en líneas celulares neoplásicas y no neoplásicas. Normalizamos la expresión del gen *KDM4A* con respecto MCF 10A a la cual asignamos un valor de 1. Se extrajo RNA total de las líneas celulares por el método de Trizol, se sintetizó cDNA a partir de 1 µg de RNA el cual se utilizó como templado para las reacciones de qPCR. Se emplearon oligonucleótidos específicos para los oligonucleótidos específicos para *KDM4A* y *GAPDH*. Los valores promedio \pm la desviación estándar se obtuvieron a partir del triplicado experimental. (*) $p < 0.05$ con respecto a la línea celular MCF 10A.

7.2 ESTUDIO DE LA PRESENCIA Y LOCALIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS KDM4A Y CHD5 EN LÍNEAS CELULARES NEOPLÁSICAS Y NO NEOPLÁSICAS.

Con el objetivo de determinar la presencia y localización de las proteínas KDM4A y CHD5 en líneas celulares neoplásicas y no neoplásicas se realizaron ensayos de inmunofluorescencia (IF). Los resultados mostraron que la localización de KDM4A se observa principalmente en el núcleo de las células neoplásicas, MCF7, MDA-

MDA-MB-231 y HeLa, en contraste en la línea celular MCF 10A, no se detectó esta proteína (Figura 5).

Por el contrario, la proteína CHD5, se encuentra en el núcleo de la línea celular MCF 10A, y en menor proporción en el núcleo de la línea celular MDA-MB-231, no se observó en las líneas celulares MCF7 y HeLa (Figura 6). Estos datos proponen una relación entre la presencia de KDM4A y la ausencia de CHD5.

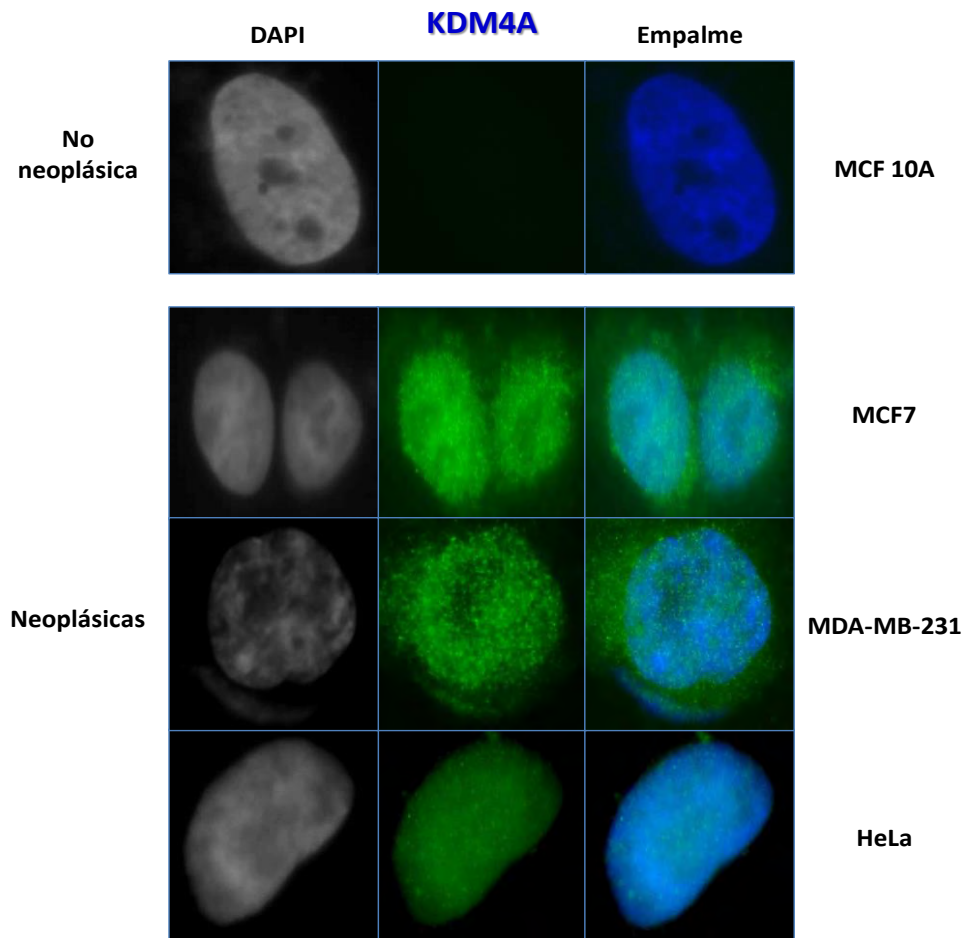


Figura 5. Detección de la presencia y la localización por citoimmunofluorescencia, de la desmetilasa de histonas KDM4A en líneas celulares neoplásicas (MDA-MB-231, MCF7, HeLa) y una no neoplásica (MCF 10A) (100 aumentos). Encontramos que KDM4A se encuentra principalmente en el núcleo de las células neoplásicas, MCF7, MDA-MB-231 y HeLa, así mismo se observa que KDM4A está presente en el citoplasma de las células cancerosas de mama, en contraste, en la línea celular MCF 10A no se detectó esta proteína. En la columna de la izquierda se observa el núcleo de las distintas líneas celulares teñido con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), en la columna central se observa la detección de KDM4A mediante un anticuerpo primario monoclonal, el cual es específico para KDM4A y fue detectado por un anticuerpo secundario

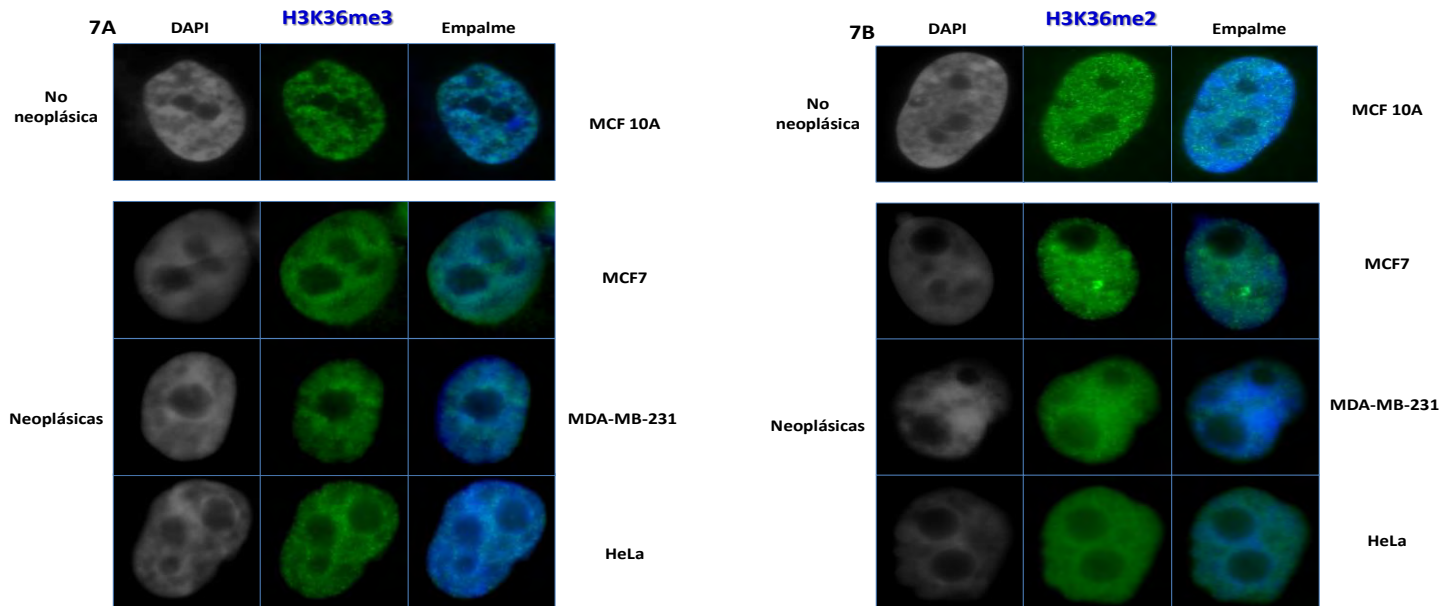
acoplado a un fluoróforo (ALEXA 488). En la columna derecha se observa el empalme del núcleo con KDM4A.



Figura 6. Detección de la presencia y localización de la proteína CHD5 en líneas celulares neoplásicas (MDA-MB-231, MCF7, HeLa) y una no neoplásica (MCF 10A) (100 aumentos). Se encontró que la helicasa, CHD5, se localizó en el núcleo celular de la línea celular no neoplásica y en menor proporción encontramos presencia de esta proteína en la línea celular cancerosa de mama MDA-MB-231, en contraste, no detectamos CHD5 en las líneas celulares neoplásicas MCF7 y HeLa. En la columna de la izquierda se observa el núcleo de las distintas líneas celulares teñido con DAPI, en la columna central se observa la detección de KDM4A mediante un anticuerpo es específico para CHD5 y fue detectado por un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo (ALEXA 488). En la columna derecha se observa el empalme del núcleo con CHD5.

7.3 ANÁLISIS DE LAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS HISTONAS H3K36me3, H3K36me2, H3K9me3 y H3K9me2.

Con la finalidad de analizar la presencia de las modificaciones H3K9me3, H3K36me3, H3K9me2 y H3K36me2 a nivel celular, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia en las líneas celulares neoplásicas MDA-MB-231, MCF7, HeLa y en la línea celular no neoplásica MCF 10A. La localización de las modificaciones H3K36me3, H3K36me2 y H3K9me2 fue principalmente nuclear (Figuras 7A, 7B y 7D), así mismo, el análisis de la marca de histonas H3K9me3 comprobó que está asociada con la heterocromatina nuclear, encontrándose en las regiones perinucleolares, perinucleares y corpúsculos de Barr (Figura 7C). Los resultados indican que no hay cambios a nivel celular de la presencia de las modificaciones postraduccionales de las histonas asociadas a KDM4A, lo cual sugiere, a su vez que estos cambios pudieran presentarse a nivel local.



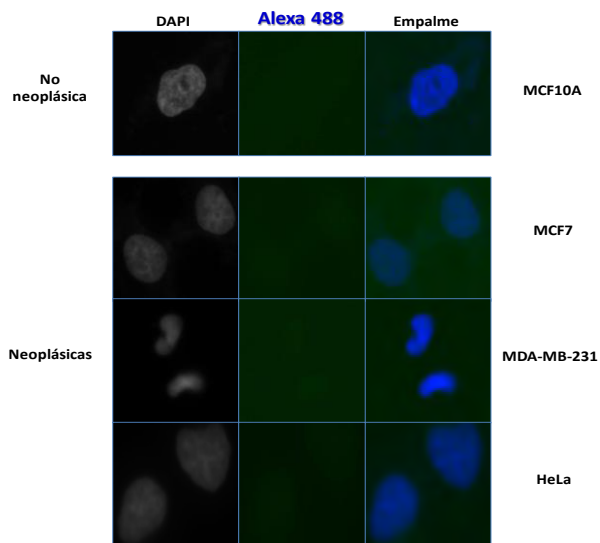
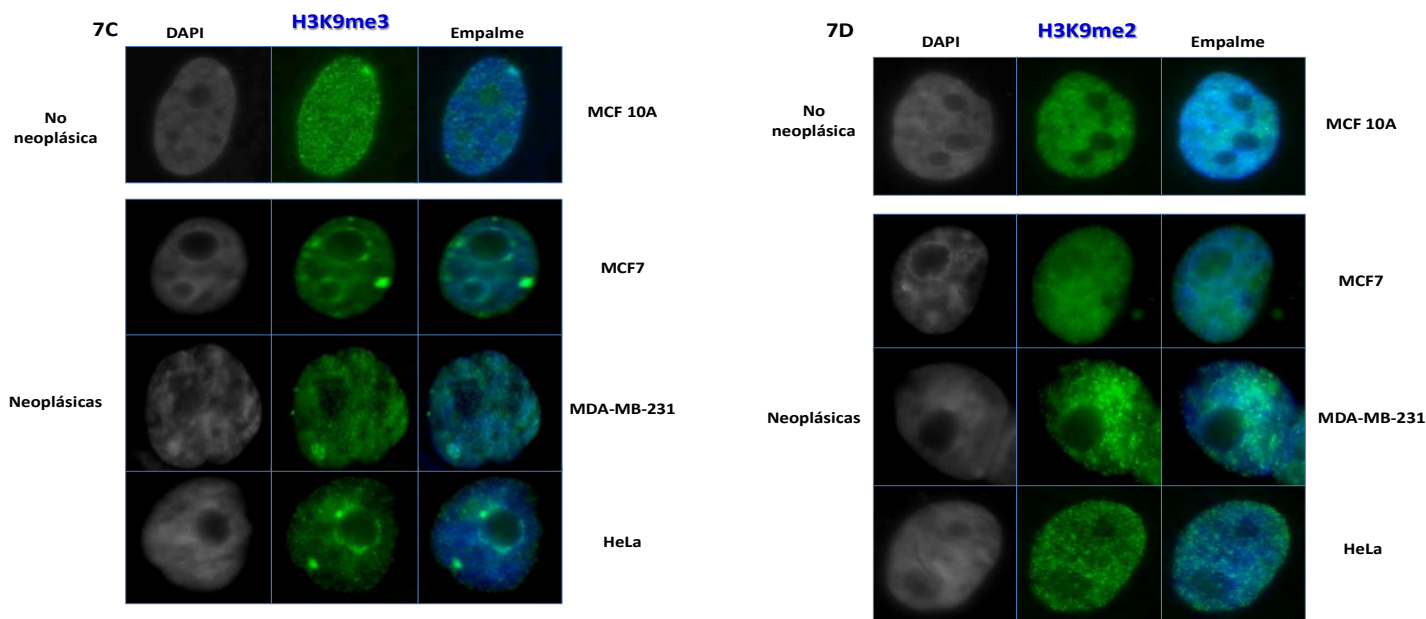
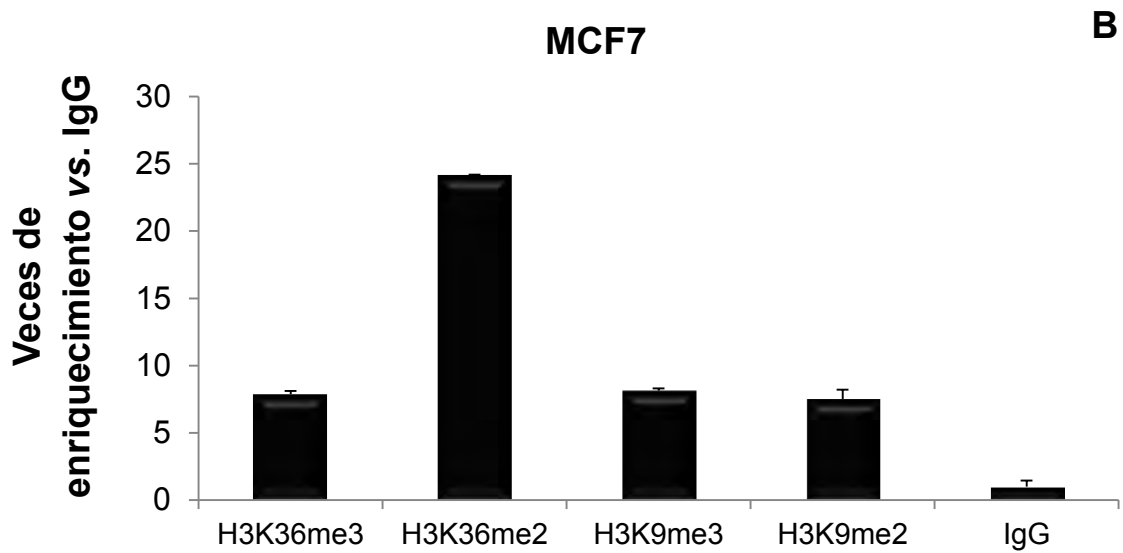
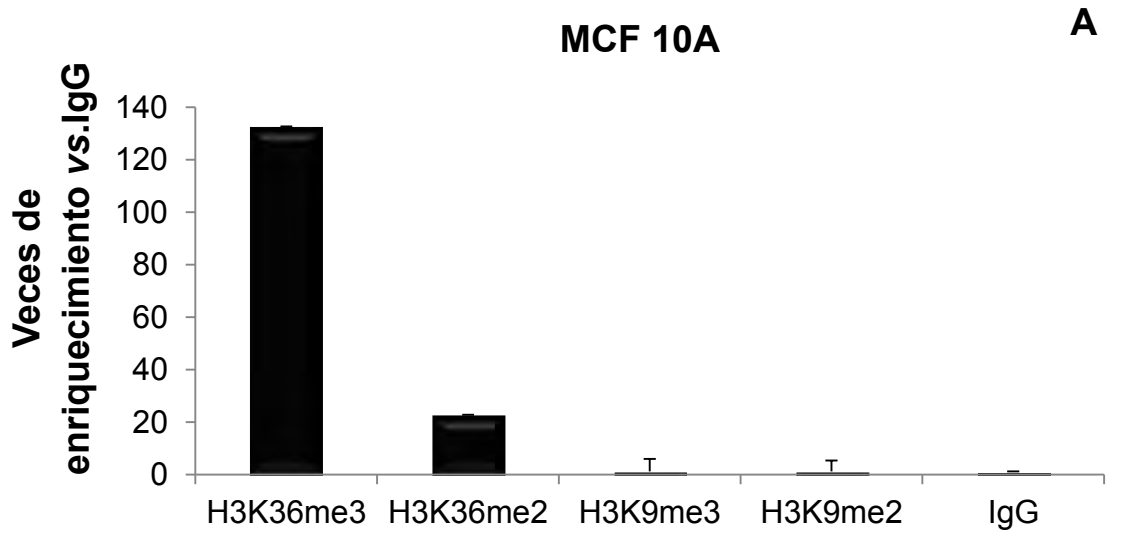


Figura 7: Detección de las modificaciones H3K36me3 (A), H3K36me2 (B), H3K9me3 (C) y H3K9me2 (D) en líneas celulares neoplásicas (MDA-MB-231, MCF7, HeLa) y una no neoplásica (MCF 10A) (100 aumentos). (A, B) La localización de la señal para las modificaciones H3K36me3 y H3K36me2 fue enteramente nuclear. (C) La localización de la señal para la modificación covalente H3K9me3 fue en su totalidad nuclear además esta se encontró asociada a regiones heterocromatinicas como los corpúsculos de Barr, regiones perinucleolares y perinucleares, esto lo observamos en todas las líneas celulares (D) Encontramos la modificación postraducciona H3K9me2 completamente en el núcleo de las células neoplásicas y la no neoplásica. En la columna de la izquierda se observa el núcleo de las distintas líneas celulares teñido con DAPI, en la columna central se observa la detección de las modificaciones mediante un anticuerpo es específico para ellas el cual fue detectado por un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo (ALEXA 488). En la columna derecha se observa el empalme del núcleo con las modificaciones respectivas. (E) Control del anticuerpo secundario Alexa 488 (40 aumentos).

7.4 ANÁLISIS LOCAL DE LA PRESENCIA DE KDM4A, CTCF Y LAS MODIFICACIONES H3K9me3/2 y H3K36me2 EN LA REGIÓN LOCALIZADA A +741pb EN EL GEN CHD5

El factor nuclear CTCF (también conocido como factor de unión CCCTC) es una proteína localizada principalmente en el núcleo celular (Lobanenkov *et al.*, 1990; Ohlsson, *et al.*, 2001). La estructura de la proteína CTCF se caracteriza por tener 11 dedos de zinc con los cuales se puede unir a su secuencia blanco en el DNA, así mismo CTCF puede interactuar a múltiples proteínas gracias sus extremos amino y carboxilo. Estudios *in vitro* han demostrado que la actividad de KDM4A se incrementa en presencia de CTCF, sugiriendo que *in vivo* pudiera existir alguna interacción de CTCF y KDM4A (Jeong *et al.* 2011). Con el objetivo de determinar si CTCF pudiera estar interactuando con KDM4A y evaluar las modificaciones postraduccionales de las histonas H3K9me3, H3K9me2, H3K36me3, H3K36me2 en la zona localizada a +741 pb en gen *CHD5*, realizamos una inmunoprecipitación de la cromatina en las líneas celulares MCF10A, MCF7, MDA-MB-231 y HeLa, (figuras 8A, 8B, 8C, 8D, 8E). La región localizada a +741 pb en *CHD5*, fue donde previamente se demostró la unión de KDM4A *in vivo* en la línea celular U2OS derivada de osteosarcoma (Malette y Richard 2012). Las inmunoprecipitaciones se evaluaron por medio de qPCR. Encontramos la presencia de KDM4A y CTCF en las líneas celulares neoplásicas y no en la línea MCF 10A. Los datos obtenidos proponen que aparentemente hay una relación entre la KDM4A y CTCF, y que posiblemente CTCF pudiera estar mediando el reclutamiento de la desmetilasa de histonas KDM4A a su sitio blanco. En las líneas celulares neoplásicas, la presencia de KDM4A se asocia con la disminución de las modificaciones covalentes H3K36me y H3K9me trimetiladas en comparación con las dimetiladas (Figura 8A, 8C, 8D, 8E). En MCF 10A (Figura 8B), se observa principalmente un enriquecimiento de H3K36me3 con respecto a H3K36me2, lo cual pudiera relacionarse con una mejor procesividad de la RNA Polimerasa II. Así mismo las modificaciones covalentes H3K9me3 y H3K9me2 se presentan poco enriquecidas lo cual apunta que la conformación de la cromatina en dicha región es laxa. El análisis de las modificaciones covalentes de las

histonas nos indica que hay una asociación entre la presencia de KDM4A y la disminución de H3K36me3 y H3K9me3 en las líneas celulares neoplásicas, esto sugiere que KDM4A pudiera estar desmetilando a dichos residuos.



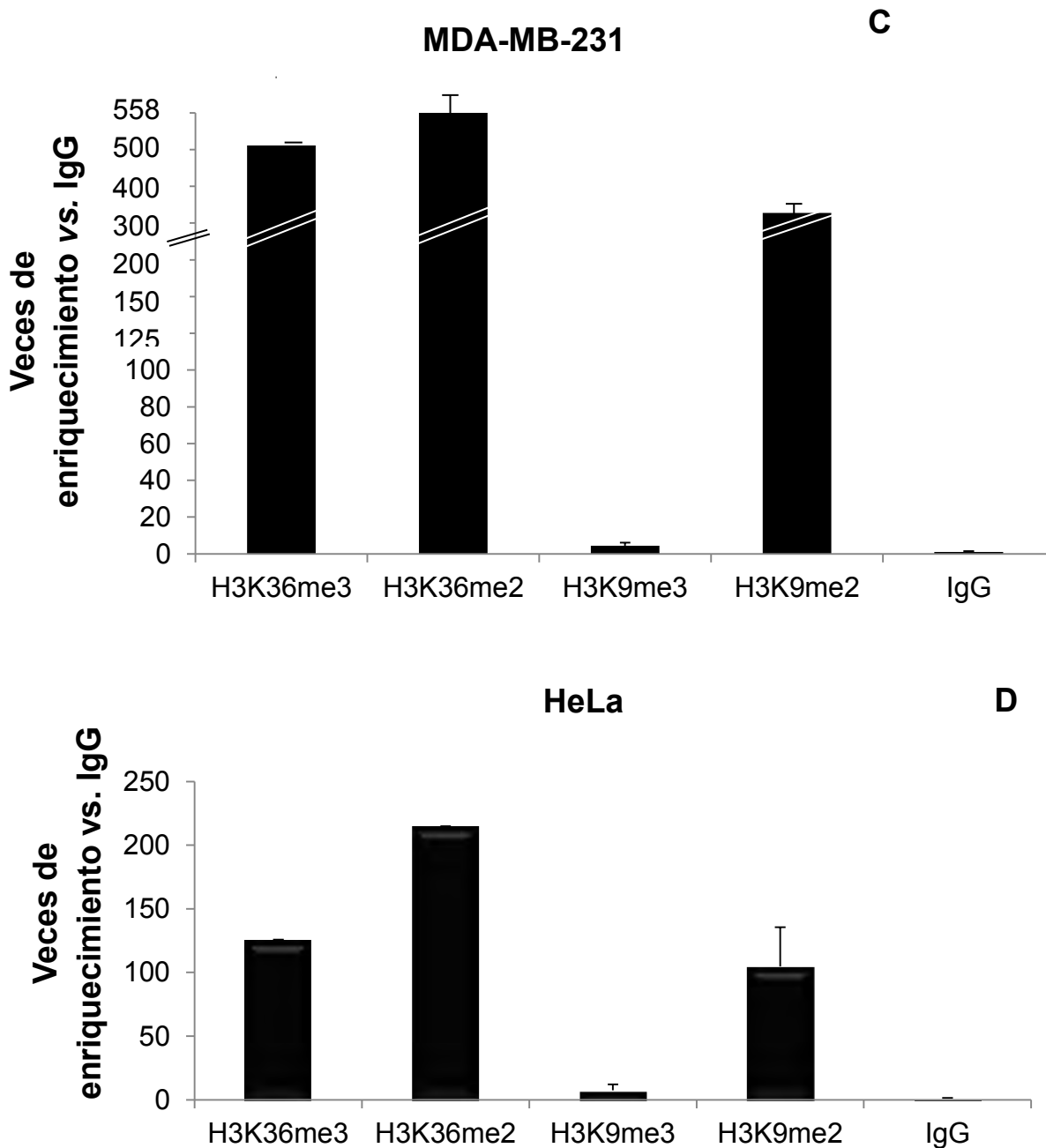


Figura 8: Análisis local de la presencia de las modificaciones postraduccionales H3K36me3/2 y H3K9me3/2, de las histonas en la región localizada a +741pb en el gen *CHD5*. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de la zona situada a +741pb en *CHD5*, en las líneas celulares MCF 10A (A), MCF7 (B), MDA-MB-231 (C) y HeLa (D). Los resultados se presentan en veces de enriquecimiento de las inmunoprecipitaciones con respecto al anticuerpo inespecífico (IgG). Las barras indican la modificación que se inmunoprecipitó, en la primera barra (de izquierda a derecha) se evaluó la inmunoprecipitación de H3K36me3, en la segunda H3K36me2, en la tercera H3K9me3, en la cuarta H3K9me2, en la última se inmunoprecipitó con el anticuerpo inespecífico IgG. Lo que se encuentra por arriba del anticuerpo inespecífico, IgG, se considera como inmunoprecipitación significativa. Los valores promedio \pm la desviación estándar, se obtuvieron a partir del triplicado experimental.

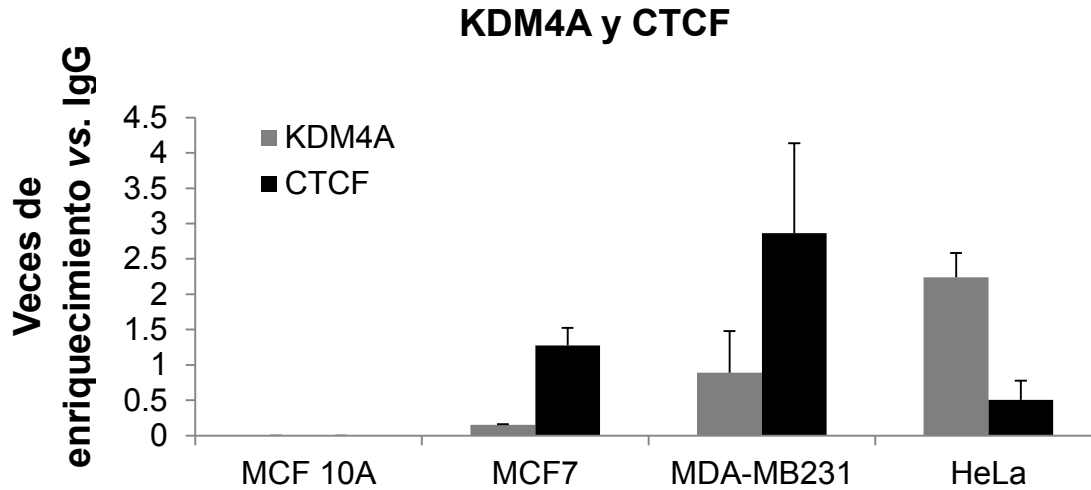


Figura 9: Análisis local de la presencia de KDM4A y CTCF en la región localizada a +741pb en *CHD5*. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de la zona situada a +741pb en *CHD5*, en las líneas celulares MCF 10A, MCF7, MDA-MB-231 y HeLa. Los resultados se presentan en veces de enriquecimiento de las inmunoprecipitaciones con respecto al anticuerpo inespecífico (IgG). Las barras negras indican la inmunoprecipitación de CTCF y las barras grises la inmunoprecipitación de KDM4A. Los resultados se normalizaron con respecto al valor de IgG de cada línea celular.

8 DISCUSIÓN

En eucariontes, la estructura de la cromatina regula el acceso de la maquinaria transcripcional a diversos elementos genéticos, jugando un papel importante en la regulación de la expresión génica. La transición de cromatina transcripcionalmente activa a heterocromatina es controlada, en parte, por la metilación del DNA y las modificaciones postraduccionales de las histonas, entre otros (Jenuwein y Allis 2001). En cáncer, la arquitectura de la cromatina se ve modificada tanto local como globalmente, y se ha sugerido que la desregulación de metilación y desmetilación de histonas se encuentra involucrada en esta alteración de la cromatina (Cloos *et al.* 2008; Jovanovic *et al.* 2010).

La variación de los patrones de metilación y desmetilación de histonas contribuye a regular la actividad transcripcional en un tiempo y espacio específico, por lo que la desregulación en los genes que codifican para las enzimas que desmetilan a las histonas pudiera derivar en el desarrollo de enfermedades como el cáncer (Black *et al.* 2013), como ejemplo se ha visto una expresión aberrante de *KDM4A* en diversos tipos de cáncer, entre ellos, cáncer de mama, sugiriendo que esta enzima pudiera estar involucrada en esta enfermedad (Berry *et al.* 2012; LI *et al.* 2013).

KDM4A tiene la capacidad de remover los grupos metilo de la lisina 9 y 36 de la histona 3. La modificación postraducciona H3K9me3 se encuentra asociada a la estructuración de heterocromatina (Caro *et al.* 2012) mientras que H3K36me3 se relaciona con la elongación de la RNA polimerasa II y la conformación de una cromatina transcripcionalmente activa (Li *et al.* 2007; Vavouri y Lehner 2012).

Se sabe que *KDM4A* se une a la zona localizada +741pb con respecto al TSS del gen supresor de tumores *CHD5* y su abatimiento provoca un aumento en la expresión de dicho gen, en la línea celular de osteosarcoma U2OS (Malette y Richard 2012), sin embargo, actualmente se desconoce el mecanismo por el cual *KDM4A* regula negativamente a *CHD5*.

Por ende el objetivo principal de este trabajo fue determinar el papel de la desmetilasa de histonas *KDM4A* y las modificaciones postraduccionales

H3K36me₃/2 y H3K9me₃/2 en la regulación del gen *CHD5* en un modelo de cáncer de mama.

Inicialmente, se caracterizó la expresión de *KDM4A*, en 2 líneas celulares derivadas de cáncer de mama, (MCF7 y MDA-MB-231), una línea celular no neoplásica, MCF 10A, y una línea celular en la cual ya se ha reportado que el gen *KDM4A* se sobreexpresa, nuestro control positivo, fue la línea celular derivada de cáncer cervico-uterino HeLa. Los resultados normalizados con respecto a MCF 10A, mostraron que la líneas celulares neoplásicas HeLa, MCF7 y MDA-MB-231, sobreexpresan el gen *KDM4A* en comparación con MCF 10A (Figura 4). Estos datos sugieren que *KDM4A* se expresa basalmente en la línea celular no neoplásica MCF 10A y mientras que en las líneas celulares neoplásicas hay sobreexpresión de este gen. Los resultados obtenidos concuerdan con la literatura, la cual indica que los niveles de *KDM4A* son mayores en tumores de cáncer de mama, (Berry et al. 2012; LI et al. 2013) y sugieren que *KDM4A* podría estar involucrada en el desarrollo de esta enfermedad.

Posteriormente, con el fin de evaluar la presencia y localización de *KDM4A* y *CHD5* se llevaron a cabo inmunofluorescencias, los resultados revelaron que la localización de *KDM4A* se observa mayoritariamente en el núcleo de las células neoplásicas mas no en la línea celular MCF 10A donde no se detectó esta desmetilasa (Figura 5), estos resultados coinciden con el análisis de expresión. En contraste con la presencia de *KDM4A*, la proteína *CHD5*, se encontró en el núcleo de la línea celular MCF 10A, y en menor proporción en la línea celular MDA-MB-231, no detectamos a esta helicasa en las líneas celulares MCF7 y HeLa (Figura 6), estos datos también concuerdan con los reportados en la literatura, los cuales demostraron la baja presencia de *CHD5* en líneas celulares neoplásicas comparadas con células normales (Mulero-Navarro y Esteller 2008).

Con el objetivo de evaluar las modificaciones postraduccionales de histonas, H3K9me₃, H3K36me₃, H3K9me₂ y H3K36me₂ a nivel celular, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencias en las líneas celulares neoplásicas MDA-MB-231, MCF7, HeLa y en la línea celular no neoplásica MCF 10A(Figuras 7A, 7B, 7C

y 7D). Los resultados revelaron que la localización de las modificaciones H3K36me3, H3K36me2 H3K9me3 y H3K9me2 fue enteramente nuclear y aparentemente, no hay cambios a nivel global de las modificaciones postraduccionales de las histonas afectadas por KDM4A sugiriendo que esta desmetilasa pudiera estar actuando de manera local en los modelos celulares estudiados.

Los resultados obtenidos del análisis de expresión y de las inmunofluorescencias dirigidas hacia KDM4A y CHD5, proponen que hay una relación inversa entre la presencia de KDM4A y CHD5, es decir, donde se encuentra KDM4A no está presente CHD5, esto nos podría indicar que KDM4A está regulando de manera negativa a *CHD5*. Lo anterior ya ha sido evidenciado, mediante un RNA de interferencia dirigido contra KDM4A, en la línea celular U2OS (Figura 3B, 3C, 3D y 3E) (Mallette y Richard 2012) así mismo, se determinó que KDM4A se une a la región +741 del gen *CHD5* (Figura 3A). Actualmente se sabe poco acerca de cómo las desmetilasas de histonas como KDM4A pueden ser reclutadas a sus sitios blanco, uno de los candidatos potenciales pudiera ser el factor nuclear CTCF. Esta proteína se caracteriza por tener 11 dedos de Zinc con los cuales se puede unir a su secuencia blanco en el DNA, CTCF también puede interactuar a múltiples proteínas y RNAs gracias sus extremos amino y carboxilo terminal (Phillips y Corces, 2009). Estudios *in vitro* han demostrado que la actividad de KDM4A se incrementa en presencia de CTCF, sugiriendo que *in vivo* pudiera existir alguna interacción de CTCF y KDM4A (Jeong *et al.* 2011), sin embargo, aún no se sabe si KDM4A y CTCF interactúan *in vivo*, con el fin de determinar la posible relación entre CTCF y KDM4A y evaluar las modificaciones postraduccionales de las histonas H3K9me3, H3K9me2, H3K36me3, H3K36me2 en la región +741 del gen *CHD5* se realizó una inmunoprecipitación de la cromatina, en líneas celulares MCF10A, MCF7, MDA-MB-231 y HeLa (figuras 8A, 8B, 8C, 8D y 9). De manera interesante se encontró que la presencia de KDM4A en la región +741 del gen *CHD5* sólo se observa en presencia de CTCF en las líneas celulares neoplásicas mas no en MCF 10A. Esto pudiera indicar una posible relación entre CTCF y KDM4A (Figura 9). Existen pocos estudios donde se ha

reportado que CTCF puede actuar como un represor transcripcional. Se han propuesto varios mecanismos, uno de ellos es la asociación con el co-represor SIN3A y HDACs (Lutz *et al.* 2000), adicionalmente, *c-MYC*, *Bax*, *hTERT*, son ejemplos de genes que están regulados de manera negativa por la unión de CTCF-P (CTCF- fosforilado) a regiones localizadas río abajo del TSS, esta unión, impide el reconocimiento de diversos factores de transcripción. (Filippova *et al.* 1996; Renaud *et al.* 2005; Méndez-Catalá *et al.* 2013). También, hay evidencias de que la represión de los genes ribosomales, depende, en parte, de la poli-ADP-ribosilación de CTCF, modificación post-traduccional que ayuda en la localización de CTCF en el nucléolo y se ha sugerido que CTCF-poli-ADP-ribosilado, reprime la transcripción del rDNA (Torrano *et al.* 2006). A su vez, estudios han demostrado que CTCF juega un papel de muy relevante en la inactivación del cromosoma X, ya que se une al promotor del RNA no codificante *Jpx*, donde su transcripción es indispensable para la transcripción de *Xist* el cual es necesario para llevar a cabo la inactivación del cromosoma X en hembras (Sun *et al.* 2013).

En conclusión nuestros datos podrían sugerir que el factor nuclear CTCF pudiera fungir como un regulador negativo de la expresión del gen *CHD5*, donde el mecanismo principal de CTCF es inhibir la transcripción alterando la procesividad de la RNA Polimerasa II.

La presencia de KDM4A *in vivo* en la región localizada a +741pb en el gen *CHD5* se asoció con la disminución de la marca H3K36me3 en comparación con H3K36me2 en las líneas celulares neoplásicas. Esto nos sugiere que KDM4A se encuentra desmetilando sus sustratos. A su vez, los niveles de H3K36me3, se ven disminuidos en las líneas celulares MCF7 (8C) y HeLa (8D) en comparación de MCF 10A (8B) y de manera interesante se observaron altos niveles de H3K36me3 y H3K36me2 en la línea neoplásica MDA-MB-231, en comparación con la línea celular MCF 10A.

En las líneas celulares cancerosas, encontramos un enriquecimiento de las marcas H3K9me3 y H3K9me2, las cuales se asocian con represión transcripcional y heterocromatina (Hahn *et al.* 2011, Lienert *et al.* 2011, Caro *et al.* 2012), sin

embargo en MCF 10A se encontraron niveles muy bajos (alrededor de 1.2 veces de enriquecimiento) de estas modificaciones. Se distingue una disminución de H3K9me3 con respecto H3K9me2 en MDA-MB-231 y HeLa (figuras 8D y 8E), estos resultados indican que KDM4A se encuentra desmetilando, además corroboran que KDM4A posee más afinidad por H3K9me3 que por H3K36me3 (Chen *et al.* 2006; Huang *et al.* 2006; Whetstine *et al.* 2006), ya que el nivel de H3K9me3 es menor que H3K36me3.

Conjuntando los resultados obtenidos; en la línea celular MCF 10A (Figuras 8A y 9) no se encuentran KDM4A, CTCF y a su vez, las marcas represivas H3K9me3 y H3K9me2 se encuentran muy poco enriquecidas en comparación con las células neoplásicas (1.26 y 1.20 veces de enriquecimiento respectivamente), así mismo, H3K36me2 se encuentra en un valor menor, 22.84, con respecto a las células cancerosas, por el contrario se encontró enriquecida alrededor de 132 veces la marca asociada con la elongación de la polimerasa, H3K36me3, estos datos nos indican que la cromatina de esta región está transcripcionalmente activa y correlacionan con la presencia de la proteína CHD5 en el núcleo de MCF 10A.

En la línea celular MCF7 (Figuras 8B y 9) se encontraron KDM4A, CTCF y de manera interesante, los niveles de H3K9me3, son ligeramente más altos (8.14 veces de enriquecimiento) con respecto a H3K9me2 (7.51 veces de enriquecimiento), éstos datos pudieran ser interpretados como una desmetilación de H3K9me2 a la forma monometilada, H3K9me1 Este mecanismo podría estar mediado por enzimas que sean capaces de desmetilar H3K9me2 como las desmetilasas KDM3A y KDM1 (Kuroki *et al.* 2013, Metzger *et al.* 2005). A su vez, H3K36me2 se encuentra enriquecida 24.10 veces y H3K36me3 7.86 veces. Estos resultados sugieren que la cromatina de esta región se encuentra transcripcionalmente inactiva donde la pérdida de H3K36me3 interfiere con la elongación de la RNA polimerasa II, lo anterior se relaciona con la ausencia de CHD5 en MCF7.

En la línea celular derivada de cáncer de mama MDA-MB-231 (Figuras 8C y 9), se encontraron KDM4A, CTCF, las marcas represivas H3K9me3 y H3K9me2 (con

4.38 y 267.86 veces de enriquecimiento), interesantemente se observó un aumento de las marcas H3K36me3 y H3K36me2 (con 526.08 y 559.64 veces de enriquecimiento) con respecto a MCF 10A, la baja abundancia de CHD5, se pudiera deber a la presencia de marcas de represión (como H3K9me3, H3K9me2 y la hipermetilación del promotor; (Mulero-Navarro y Esteller 2008) y marcas de activación (como H3K36me3).

Finalmente, en la línea celular HeLa (Figuras 8D y9) se encontró, KDM4A, CTCF, las marcas represivas H3K9me3 y H3K9me2 (con 7.33 y 104.67 veces de enriquecimiento), H3K36me3 en un valor menor (125.59 veces de enriquecimiento) que H3K36me2 (214.54 veces), esto nos indica que la cromatina de esta región se encuentra transcripcionalmente inactiva, y se relaciona con la ausencia de CHD5 en la línea celular HeLa.

Estos datos proponen un nuevo mecanismo de inactivación genética donde los mecanismos epigenéticos alteran el proceso de elongación de la RNA polimerasa II.

9 CONCLUSIONES

En nuestro trabajo demostramos que *KDM4A* se encuentra sobreexpresado en líneas celulares neoplásicas en comparación con una línea celular no neoplásica, esta sobreexpresión se asoció con la disminución de la proteína CHD5. Por medio de ChIP determinamos *in vivo* la presencia de KDM4A en la región localizada a +741 pb en el gen *CHD5*, esto se relacionó con la disminución de H3K36me3 y el aumento de H3K36me2. Así mismo, en las líneas celulares neoplásicas hay un enriquecimiento de las marcas represivas H3K9me3 y H3K9me2.

Por otro lado, observamos una relación entre la presencia de CTCF y KDM4A, esto pudiera sugerir que el factor nuclear CTCF podría jugar un papel relevante en el reclutamiento de KDM4A a su sitio blanco.

Nuestros resultados proponen un posible nuevo mecanismo de inactivación del gen *CHD5* donde los mecanismos epigenéticos pudieran alterar la elongación de la RNA polimerasa II.

10 PRESPECTIVAS

10.1 COMPROBAR EL ESTADO DEL PROMOTOR DE *CHD5* ASÍ COMO ANALIZAR LA EXPRESION DE ESTE GEN MEDIANTE RTq-PCR.

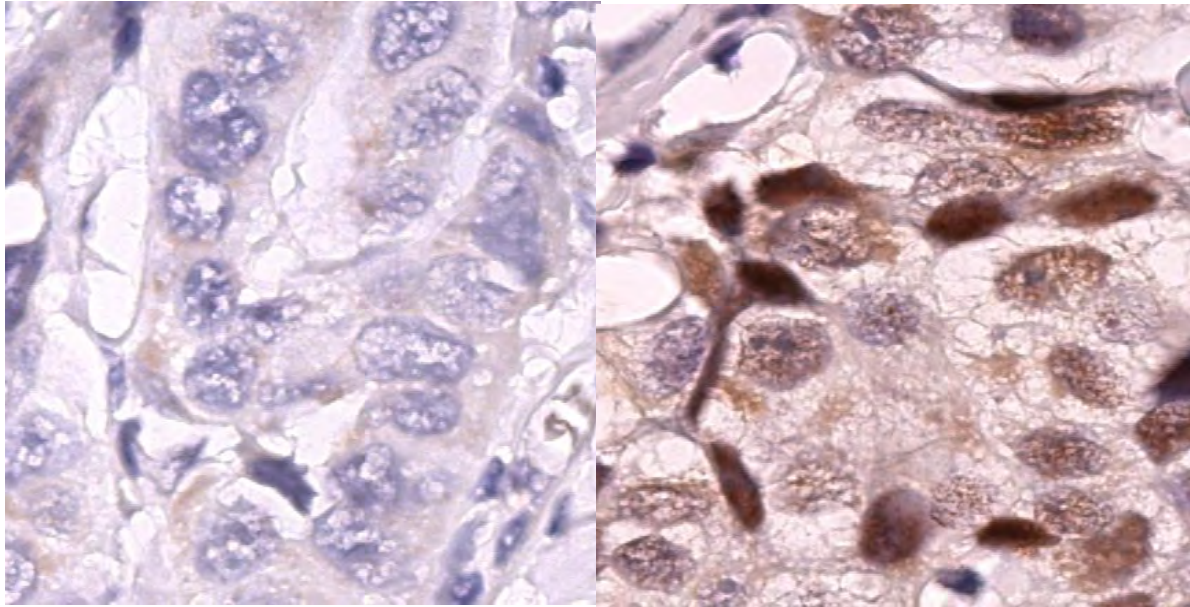
El promotor de *CHD5* se encuentra embebido en una isla CpG, como se mencionó anteriormente, uno de los mecanismos para inactivar este gen es la hipermetilación del promotor como es el caso la línea celular MDA-MB-231, no obstante no se encontró metilación de promotor en MCF7, HeLa, y en mama normal.

Para corroborar la metilación del promotor, se debería de hacer una conversión con bisulfito de sodio, seguido de una PCR sensible a metilación, (msPCR, por sus siglas en inglés). Con el objetivo de analizar la expresión del gen *CHD5*, se realizara una RT-qPCR, con oligos específicos para *CHD5*, los cuales ya están diseñados.

Nombre y función	Oligonucleótidos	Secuencia en DNA (5' – 3')	Tm (°C) teórica	Tamaño esperado en cDNA	Tamaño esperado en DNA genómico
	<i>CHD5</i> FWD (Exón 42)	TCGAGACTTCCCTGTGTTGC	62	127 pb	933 pb
Expresión <i>CHD5</i>	<i>CHD5</i> RVS (Exón 44)	CTTTTTGTCCCAAGGTGGCG	62		

10.2 EVALUAR LA PRESENCIA Y LOCALIZACIÓN DE KDM4A EN CORTES DE TEJIDO DE PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

Con el objetivo de determinar la presencia y localización de las proteínas KDM4A y *CHD5* en muestras de pacientes con cáncer de mama se realizó una inmunohistoquímica de un corte histológico de una muestra con cáncer de mama. (Figura 7).



A

B

Figura 10. Presencia y localización de KDM4A en muestras de pacientes con cáncer de mama. A. control negativo (sin anticuerpo primario) B, Localización nuclear de la proteína KDM4A en una muestra de cáncer de mama. (100 aumentos)

10.3 DETERMINAR EL PAPEL DE CTCF EN EL RECLUTAMIENTO DE LA DESMETILASA DE HISTONAS KDM4A EN UN MODELO DE CÁNCER DE MAMA

Actualmente se desconoce cómo las desmetilasas de histonas son reclutadas a sus sitios blanco. Una de las proteínas que pudiera ser clave en éste fenómeno es CTCF. Esta proteína está compuesta por 11 dedos de Zinc con los cuales se une al DNA y una región NH y COOH terminal con las que puede interaccionar con múltiples proteínas (Zlatanova y Caiafa 2009). Estudios in vitro han demostrado que la actividad de KDM4A se incrementa en presencia de CTCF, sugiriendo que CTCF, pudiera estar actuando como un posible mediador de la función de KDM4A (Jeong *et al.* 2011). Con el objetivo evaluar el efecto de CTCF en la función y reclutamiento de KDM4A se realizaran ensayos con RNAs de interferencia dirigidos contra CTCF. Se evaluara por medio de Ensayo de cambio en la corrida

electroforética (EMSA) y RE-ChIP la interacción entre CTCF y KDM4A tanto en un modelo no neoplásico como en las líneas celulares de cáncer de mama. Mediante ensayos de RE-ChIP-seq, se determinarán los genes blanco de CTCF-KDM4A.

11 MÉTODOS EN EXTENSO

11.1 EXTRACCIÓN DE RNA

1. Retirar el medio de cultivo, lisar las células directamente en el frasco de cultivo mediante la adición de 3 mL de TRIZOL para cajas de 75 cm², y mezclar varias veces con una pipeta, con el fin de que las células se despeguen en su totalidad.
2. Trasladar el TRIZOL con células a un tubo Falcon ® de 15 mL, incubarlas a temperatura ambiente (15°C-30°C) por 5 minutos.
3. Agregar 0.2 mL de cloroformo por cada mL de TRIZOL agregado, agitar vigorosamente los tubos con la mano durante 15 segundos. Lo anterior se realiza con el fin de limpiar el RNA.
4. Centrifugar las muestras a 3,200 x g durante 15 minutos, a una temperatura de 2-8°C. Después de la centrifugación la mezcla se divide en tres fases: superior: fase acuosa; media: fase fenol-cloroformo; inferior: fase roja. El RNA se encuentra solamente en la fase acuosa.
5. Transferir, cuidadosamente la fase acuosa a un tubo Eppendorf etiquetado, perturbar la fase de fenol-cloroformo, de hacerlo centrifugar de nuevo.
6. Agregar 0.5 mL de alcohol isopropílico por cada mL utilizado de TRIZOL. Lo anterior ayuda a precipitar el RNA.
7. Incubar por 10 minutos a Temperatura ambiente y centrifugar a no más de 25,910 x g durante 15 minutos, a una temperatura de 2°C a 8°C. Después de esta centrifugación es posible que se vea el pellet de RNA, si no sucede esto dejar un pequeño remanente de líquido en la parte inferior del tubo.
8. Retirar el sobrenadante y lavar el pellet con 1 mL de ET-OH al 80% en agua libre de RNAsas, mezclar vigorosamente, (con vortex), centrifugar la muestra durante 5 minutos a 16,580 x g con una temperatura de 2°C a 8°C.
9. Dejar secar el botón de RNA a temperatura ambiente, y resuspenderlo con 20 µL de agua DPEC, dependiendo del tamaño del pellet, incubar 10 minutos a 60°C.

10. Determinar la concentración de la muestra en el Nanodrop (A260/280).
11. Cuantificar la pureza e integridad del RNA mediante un gel de agarosa al 1.2 %.
12. Ajustar la concentración de RNA a 1 μ g/ μ L.
13. Conservar la muestra a -70°C.

Gel para determinar la integridad del RNA

Disoluciones

FA gel buffer 10x	Buffer de corrida
200 mM MOPS (libre de ácidos)	100 mL de FA gel buffer 10x
50 mM de acetato de sodio	20 mL de formaldehído al 37%
10 mM de EDTA	880 mL de agua libre de RNAsa
pH: 7.0 (ajustar con NaOH)	
Buffer de carga	Gel FA 1.2%
16 μ L de azul de bromofenol acuoso	1.2 g de agarosa
80 μ L de EDTA 500mM, pH: 8	10 mL de FA gel buffer 10x
720 μ L de formaldehído al 37%	Aforar a 100 mL con agua libre de RNAsa.
2 mL de glicerol 100%	Después de calentar para fundir la agarosa, agregar 1.8 mL de formaldehído al 37 %.
3084 μ L de formamida	Agregar 1 μ L de gel red por cada 25mL de gel al 1.2 %.
4 mL de FA gel buffer 10x	
Aforar a 10 mL con agua libre de RNAsa	

Preparación de la muestra

1. Cargar aproximadamente 200 ng de RNA por pozo.
2. Adicionar 2 μ L de buffer de carga.
3. Llevar todas las muestras al mismo volumen.
4. Incubar a 65°C durante 5 minutos.

5. Correr el gel FA durante 45 minutos a 95 volts.
6. Si se presenta DNA, tratar con DNAsa, agregar 1 unidad de enzima por cada microgramo de RNA, incubar a 37°C durante una hora, para inactivar la enzima, agregar 2µL de EDTA 50mM e incubar 20 minutos a 65°C

11.2 REACCIÓN DE TRANSCRIPTASA REVERSA PARA LA OBTENCIÓN DEL cDNA

1. Por cada reacción de retrotranscripción agregar:

Componente	Volumen	Concentración final
MgCl₂	4 µL	5mM
10X Buffer II para PCR	2 µL	1X
dATP	2 µL	1 mM
dCTP	2 µL	1 mM
dTTP	2 µL	1 mM
dGTP	2 µL	1 mM
Inhibidores de RNAsa	1 µL	1 U/µL
Transcriptasa reversa	1 µL	2.5 U/µL
Oligo d(T)₁₆	1 µL	2.5 µM
RNA	1 µL	≤1 µg
H₂O	2 µL	
Volumen final	20 µL	

Para la obtención del cDNA se utilizó el Kit GeneAmp® RNA PCR KIT No. De catálogo: N808-0017.

2. Programar el termociclador a 42°C durante 30 minutos (temperatura óptima de la enzima), 99°C durante 5 minutos (inactivación de la enzima), 5°C durante 5 minutos más.

3. Cuantificar el cDNA con ayuda del nanodrop y diluirlo para que el cDNA de todas las muestras se encuentre a la misma concentración, 20 ng/ μ L.
4. Por cada reacción de qPCR agregar lo siguiente:

Componente	Volumen
SYBR-GREEN	10 μ L
OLIGO FWD	1 μ L
OLIGO RVS	1 μ L
cDNA	5 μ L
H2O	3 μ L

Para el análisis de expresión se empleó el método de doble delta CT ($d\Delta$ CT). (Livak y Schmittgen 2001)

11.3 INMUNOFLUORECENCIAS (IF)

Disoluciones

Formaldehido 1 %	Tritón
370 μ L de formaldehido al 37 %	2.5 mL de tritón 100-X Aforar a 50 mL con PBS (solución a 5 %) Tomar 1 mL y llevarlo a 50 mL con PBS (solución al 0.1 %)
Glicina	PBS
0.375 g de glicina Aforar a 50 mL con PBS	8 g de NaCl. 0.2 g de KCl. 1.44 g de Na ₂ HPO ₄ . 0.24 g de KH ₂ PPO ₄ . Ajustar pH a 7.4. Aforar a 1 L.

1. Sembrar aproximadamente 100000 células en cada pozo, con un cubreobjetos previamente limpio y radiado, se dejan el cultivo de 12 a 24 horas, dependiendo de la línea celular.
2. Agregar 1 mL de formaldehído al 1 % o al 4 % a cada pozo e incubar 10 minutos.

3. Retirar el formaldehído y realizar 3 lavados con PBS reposando por 5 minutos entre cada lavado con agitación.
4. Adicionar 1 mL de tritón, incubar durante 5 minutos.
5. Retirar el tritón y realizar 3 lavados con PBS 1 mL por 5 minutos, con agitación, cuidar que no se sequen las laminillas.
6. Agregar 1 mL de glicina 100 mM y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente.
7. Eliminar la glicina y adicionar 25 μ L de anticuerpo primario, cortar parafilm y colocarlo una vez que ya se haya agregado el anticuerpo primario con el fin de que el anticuerpo y las células se encuentren en contacto y las laminillas no se sequen, incubar durante 1 hora a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C.
8. Lavar de 3 a 5 veces con PBS durante 3 minutos.
9. Agregar 25 μ L del anticuerpo secundario e incubar por una hora a temperatura ambiente, en cámara húmeda y aislado de la luz.
10. Realizar tres lavados con PBS durante 3 minutos.
11. Previamente al montaje se limpian con alcohol, los portaobjetos.
12. Posteriormente, se agregan 15 μ L de medio de montaje, Vectashield con DAPI diluido con 6.5 μ L con Vectashield sin DAPI, (Vector Labs.) (6.5:1) a cada inmunofluorescencia, se coloca el cubreobjetos procurando no dejar burbujas, se retira el excedente del medio de montaje.
13. Se sellan las muestras montadas con barniz de uñas. Las muestras se pueden conservar a 4°C tapadas con aluminio.

11.4 ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACION DE LA CROMATINA (ChIP)

Disoluciones

Buffer de entrecruzamiento	Buffer de lisis
Formaldehido al 11 %.	SDS al 1 %.

NaCl 100 mM.	EDTA 10 mM con pH 8.0
EGTA 0.5 mM.	Tris-HCl 50 mM con pH 8.0
HEPES 50 mM con pH 8.0	Inhibidores de proteasas.
Glicina 2.5 M	PBS 1x
Pesar 9.38 g de glicina	8 g de NaCl.
Aforar a 50 mL con agua	0.2 g de KCl.
bidestilada.	1.44 g de Na ₂ HPO ₄ .
	0.24 g de KH ₂ PPO ₄ .
	Ajustar pH a 7.4.
	Aforar a 1 L.

1. **CÉLULAS:** Cultivar las células en 3 cajas de 150 mm a una confluencia del 80 %, checar el volumen del medio, tiene que ser 18 mL.
2. **ENTRECRUZAMIENTO O “CROSSLINKING”:** Añadir 2 mL de buffer “crosslinking. Mix” obtener una concentración final de formaldehído al 1 %. Agitar las células por 10 minutos.
3. **DETENER EL “CROSSLINKING”:** Añadir 1 mL de glicina 2.5 M para obtener una concentración final de 125 mM. Mantener las células en agitación constante durante 5 minutos.
4. **LAVADO DE LAS CÉLULAS CON PBS:** Retirar el medio lavar las células 3 veces con PBS frío (4°C).
5. **LISIS:** Remover el PBS y se adicionar 1 mL de Buffer de Lisis con inhibidores a cada una de las cajas, e incuba a 4°C de 5-10 minutos. Transcurrido el tiempo cosechar las células con un scraper y transferir la cromatina a un tubo Falcon de 50 mL.
6. **SONICACIÓN:** Colocar el tubo que contiene la cromatina en un vaso con hielo para que se mantenga frío, evitando generar mucha espuma. (PRESTAR ATENCIÓN AL PROGRAMA DEL SONICADOR). . El programa de sonicación es de 30 segundos, pulso 2.0 - 0.5, amplitud de 37% en un sonicador Ultrasonic Processor (marca GENEQ, modelo GEX500, número de catálogo

SOVC505-00). La cromatina se puede guardar a 4°C. La cromatina sonicada se puede conservar durante 3 a 4 meses con un coctel apropiado de inhibidores, y a 4°C.

7. **EVALUACIÓN DE LA CROMATINA:** Determinar el grado de fragmentación de la cromatina, el tamaño adecuado para las Inmunoprecipitaciones es de 500-700 pb. Tomar una alícuota de 100 µL y agregar 5 µL de RNasa A e incubar a 37°C durante una hora, posteriormente agregar 5 µL de proteinasa K e incubar a 65°C, por lo menos 6 horas. Subsecuentemente realizar una extracción fenol/cloroformo (llevar la muestra a un volumen final de 400 µl con agua) y se precipita el DNA (añadir 1 volumen de ET-OH al 100 % y 0.66 volúmenes de acetato de amonio al 5 M e incubar a -20°C durante toda la noche o a -80°C durante 2 horas. Finalmente, realizar un gel de agarosa al 1 % para evaluar el tamaño de la cromatina.
8. **CUANTIFICACION DE LA CROMATINA:** Para el uso del One Day ChIP Kit se necesita usar la misma cantidad de cromatina para cada IP, para esta cuantificación se procede a determinar la concentración de las cromatinas deseadas por el método de Lowry.
 - a. **Preparación de los reactivos:** Agregar 20 µL de la solución S por cada mL de la solución A.
 - b. **Curva estándar de albumina.** Partir de un stock de 1 mg/mL, realizar la curva estándar con las siguientes cantidades de albumina, 0 mg, 1 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg.
 - c. **Cargar la placa de ELISA:** Con el fin de anular el ruido causado por los detergentes se utiliza la solución S, se agrega 20µL de solución S por cada mL de reactivo A. Por cada muestra agregar 165 µL del reactivo B de Lowry, 20µL del reactivo A, de 2 µL a 5 µL de la muestra, ajustar el volumen final con agua a 200µL. Para los volúmenes de la curva estándar se pueden adicionar de 1 µL a 15 µL.
9. **INMUNOSELECCION:** Preparar el ChIP buffer 1 x, adicionar 100 mL de ChIP Buffer a 400 mL de agua desionizada, almacenar el ChIP buffer 1 x a 4°C. Preparar 5 mL de ChIP Buffer 1x con 25 µL de inhibidores de proteasas. Diluir

la cromatina con esta última mezcla de modo que el volumen de la cromatina no exceda de 28 %, por inmunoprecipitación. Repartir la cromatina en tubos de 1.5 mL.

- a. **Anticuerpos:** Añadir los anticuerpos deseados (ver tabla), agitar vigorosamente con el vortex por 5 segundos a potencia media. Incubar durante 1 hora a 4°C en movimiento.
- b. **Input:** Tomar una alícuota del mismo volumen que las inmunoprecipitaciones, esta alícuota se procesara más adelante.
- c. **Perlas:** Resuspender perfectamente las perlas antes de cada uso, tomar una alícuota de 840 µL para 20 IP, transferir estos 840 µL a un tubo de 15mL agregar 10.5mL de ChIP buffer 1x, lavar las perlas mediante la inversión del tubo. Centrifugar a 500 x g durante 3 minutos a 4°C. Repetir esta operación una vez más. Alicuotar 500 µL las perlas en tubos nuevos de 1.5 mL, centrifugar a 500 x g durante 2 minutos a 4°C, checar que todos los tubos tengan la misma cantidad de perlas. Quitar el sobrenadante, sin perturbar el pellet de perlas, mantener en hielo las perlas alicuotadas.

10. Inmunoprecipitación: Cuando termina el tiempo de incubación de la inmunoselección centrifugar los tubos que contienen los complejos anticuerpo-cromatina, a 14,000 x g, durante 10 minutos a 4°C. Este paso se realiza con el fin de eliminar agregados inespecíficos, los complejos anticuerpo-cromatina se encuentran en el sobrenadante. Transferir el sobrenadante al tubo correspondiente que contiene las perlas, tener cuidado de no perturbar el pellet ya que este contiene los agregados inespecíficos. Incubar durante 1 hora a 4°C en movimiento.

- a. **Input:** Agregar 1 mL de Et-OH al 100% a la alícuota tomada en el paso anterior. Mezclar de 2 a 3 veces por inversión, incubar durante 10 minutos en hielo, posteriormente centrifugar a 10,000 x g durante 10 minutos a 4°C. retirar el sobrenadante sin perturbar el pellet, lavar el pellet con 1 mL de Et-OH al 75 %, deshacer el pellet con ayuda de la pipeta y centrifugar a 10,000 x g durante 10 minutos a 4°C. Mantener el pellet a temperatura ambiente.

b. Aislamiento de las inmunoprecipitaciones: Una vez terminado el tiempo de incubación agregar 1 mL de ChIP buffer 1x a los tubos de 1.5 que contienen los complejos perlas-anticuerpo-cromatina, mezclar los tubos por inversión 2 veces, centrifugar los tubos a 500 x g, durante 2 minutos, a 4°C. Retirar el sobrenadante sin perturbar el pellet y agregar 1 mL más de ChIP buffer 1x, resuspender el pellet y transferirlo a un tubo Falcon de 15mL el cual contiene 12 mL de ChIP buffer 1 x frio, incubar durante 5 minutos en hielo y centrifugar a 500 x g durante 3 minutos a 4°C. Retirar 12mL de ChIP buffer 1x, resuspender el mililitro restante y trasladarlo a un tubo nuevo de 1.5 mL, centrifugar a 500 x g durante 2 minutos a 4°C, tirar el sobrenadante sin perturbar el pellet de perlas.

11. Purificación del DNA: a partir de este paso ya no trabajar en hielo, calentar agua a punto de ebullición.

a. Input: agregar 100 µL de agua para PCR y resuspender el pellet, incubar a temperatura ambiente.

b. Inmunoprecipitaciones: sacar la suspensión de purificación del DNA, es importante que durante el uso de este reactivo la suspensión sea uniforme, hay que moverlo constantemente para conservar esta uniformidad. Añadir 100 µL de suspensión purificadora a cada inmunoprecipitación. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.

c. Input: Añadir 100 µL de suspensión purificadora a. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.

d. Input e inmunoprecipitaciones: mezclar por inversión, los tubos de los dos pasos anteriores, cerrar los tubos con pinzas.

e. Revertir el entrecruzamiento: colocar los tubos en agua hirviendo durante 10 minutos. Terminado este tiempo agregar 1 µL de Proteinasa K, incubar en el termomixer a 55°C durante por lo menos 30 minutos. Terminado el tiempo de incubación cerrar los tubos con pinzas e incubarlos durante 10 minutos en agua hirviendo. Y centrifugar a 14,000 x g durante 1 minutos 4°C

f. Recuperación del DNA: sin perturbar el pellet, trasferir 70 µL del sobrenadante a otro tubo de 1.5 mL, añadir 130 µL de agua para PCR al

pellet, mezclar vigorosamente con ayuda del vortex y centrifugar a 14,000 x g, durante 1 minuto a 4°C. Sin perturbar el pellet, tomar 130 µL del sobrenadante y trasladarlo al tubo de 1.5 mL donde se encuentran los 70 µL previos, el volumen final de cada muestra es de 200 µL, conservar las muestras a -20°C.

12. Evaluación del CHIP por PCR en tiempo real y análisis de los datos.

a. Por cada reacción de qPCR añadir:

Componente	Volumen
SYBR-GREEN	10 µL
OLIGO FWD	1.5 µL
OLIGO RVS	1.5 µL
Inmunoprecipitación	5 µL
H ₂ O	2 µL
Volumen final	20 µL

b. Validación de los oligonucleótidos: se realiza una curva estándar con diluciones del input 0.01 %, 0.1 %, 1 %, 10 %, para hacer las diluciones sucesivas se toman 100 µL del tubo del input 100% y se diluyen con 900 µL de agua para PCR, de esta dilución (10% del input) se toman nuevamente 100 µL y se diluyen con 900 µL de agua para PCR, de esta dilución (1% del input) se toman nuevamente 100 µL y se diluyen con 900 µL de agua para PCR. Para obtener las diluciones 0.1% y 0.01% se repiten los pasos dos veces más.

Posteriormente graficar CT *versus* log (input %), con el uso de la pendiente de esta gráfica y la siguiente ecuación se obtiene la eficiencia de amplificación (EA), la cual debe de ser cercana a 2. (Ver grafica 1).

$$EA = 10^{(-1/m)} \rightarrow \text{Ecuación 1}$$

Dónde:

m: pendiente de la recta calculada por las diferentes concentraciones del input.

EA: eficiencia de amplificación.

- c. **% Input:** este valor indica la eficiencia de inmunoprecipitación con respecto al material inicial y se calcula con la siguiente ecuación:

$$\%Input = EA^{(Ct\ input - Ct\ ChIP)}(FD)(100) \rightarrow \text{Ecuación 2}$$

Dónde:

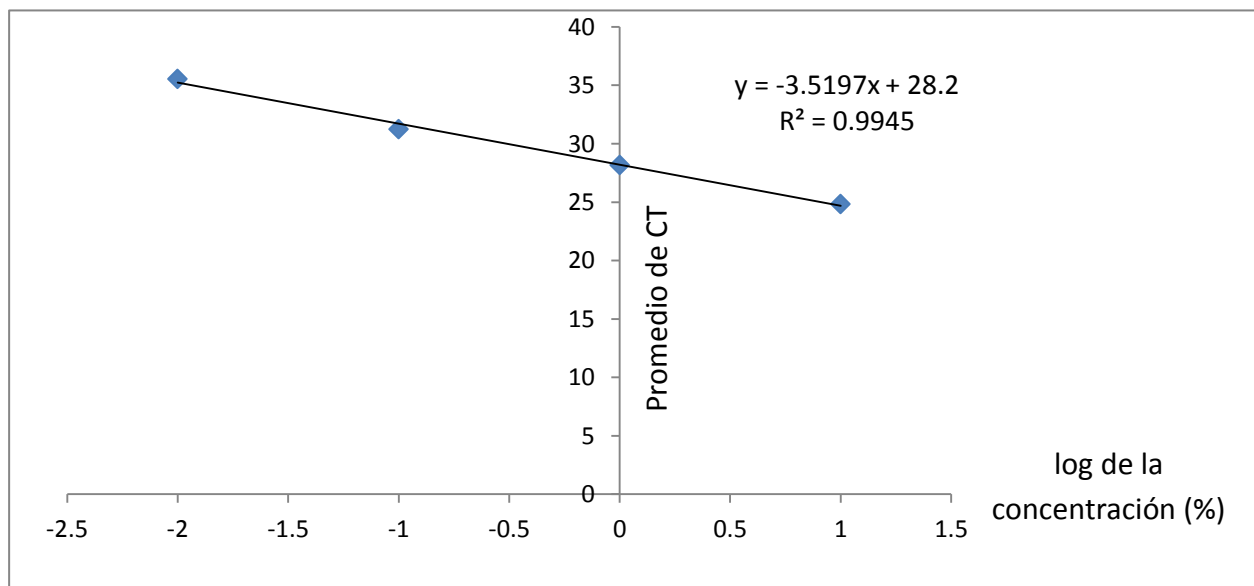
EA: eficiencia de amplificación.

FD: factor de dilución del input con el cual se comparó las inmunoprecipitaciones.

- d. **Veces de enriquecimiento:** este parámetro compara el % del input de las Inmunoprecipitaciones con el % del input de el anticuerpo inespecífico, IgG.

$$\text{veces de enriquecimiento} = \frac{\% \text{ inout loci específico}}{\% \text{ inout loci inespecífico}} \rightarrow \text{Ecuación 3}$$

Nota: Se empleó el kit **OneDay ChIP kit**, Cat. No. kch-oneDIP-060 / kch-oneDIP-180, de la marca Diagenode, así mismo, las ecuaciones aquí planteadas se extrajeron del manual de dicho Kit, para más información visitar la página: <http://www.diagenode.com/en/applications/chromatin-immunoprecipitation.php>, consultada 10/11/2013 a las 11:10 PM)



Gráfica 1: Ejemplo de curva estándar de INPUT. Las concentraciones utilizadas del INPUT de HeLa fueron, 10 %, 1 %, 0.1 % y 0.01 %.

Haciendo uso de la ecuación 1 se puede calcular la eficiencia de amplificación, $EA: 10^{(-1/m)}$, sustituyendo: $EA: 10^{(\frac{-1}{-3.5197})} = 1.92$ empleando las ecuaciones 2 y 3 es posible calcular el porcentaje del input y las veces de enriquecimiento de las inmunoprecipitaciones, con respecto al anticuerpo inespecífico, IgG.

11.5 INMUNOHISTOQUIMICAS (IHQ)

Disoluciones

Albúmina de suero bovino al 5 %	Peróxido de hidrógeno y metanol al 3 %
2.5 g de albúmina de suero bovino. Aforar a 50 mL con PBS 1 x.	100 µl de peróxido de hidrógeno (30 %). Aforar a 1 ml con 900 µl de metanol.
Buffer de citratos	PBS 1x
2.94 g de citrato trisodio (dihidratado). Ajustar pH a 6. Añadir 0.5 mL de Tween 20. Aforar a 1 L con agua destilada. Guardar a temperatura ambiente durante 4 meses o a 4°C para mayor tiempo.	8 g de NaCl. 0.2 g de KCl. 1.44 g de Na ₂ HPO ₄ . 0.24 g de KH ₂ PPO ₄ . Ajustar pH a 7.4. Aforar a 1 L.
Etanol al 70 %	Tritón x-100 al 1 %
145.83 mL de etanol al 96%. Aforar a 200 mL con agua destilada.	0.5 mL Tritón x-100. Aforar a 50 mL con PBS 1 x.

- 1. Preparación de las laminillas con el tejido mamario.** Desparafinar a 65°C durante 40 minutos en un horno de calor seco.
- 2. Hidratación de las muestras.** Sumergir las laminillas, cuidando de que cada laminilla se cubra por completo de la solución respectiva.

Sustancia	Tiempo
Xilol 1	15 minutos
Xilol 2	15 minutos
Etanol 100 %	10 minutos
Etanol 95 %	10 minutos
Etanol al 70 %	10 minutos
Agua destilada	Lavado rápido
PBS 1x frío	10 Minutos

- 3. Recuperación antigénica.** Precalear una olla a presión en el horno de microondas durante 6 a 7 minutos o hasta que suba el embolo. Añadir buffer de citratos a los *coplings* con las laminillas, cerrar y meter los *coplings* en la olla. Después de que la olla alcance la máxima presión, y comience a chillar contar un minuto. Extraer la olla del horno y colocarla debajo de agua corriente fría, enfriar los *coplings* del mismo modo. Incubar las laminillas con PBS 1 x frío durante 10 minutos y montar en una cámara húmeda.
- 4. Inhibición de la peroxidasa endógena.** Realizar 3 lavados con 100 μ L de peróxido de hidrógeno y metanol al 3% cada 15 minutos a temperatura ambiente. Al terminar, realizar 3 lavados con 100 μ L de PBS 1x cada 3 minutos.
- 5. Bloqueo de antígenos inespecíficos.** Adicionar 100 μ L de albúmina de suero bovino (BSA) al 5%. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Realizar un recambio de BSA a los 30 minutos.
- 6. Lavados.** Realizar 3 lavados con 100 μ L de Tritón X-100 al 1% cada 3 minutos. Hacer un lavado con 100 μ L de PBS 1x.
- 7. Adición del anticuerpo primario.** Añadir 100 μ L del anticuerpo primario para KDMA4A. Incubar a 4°C durante toda la noche.
- 8. Lavados.** Al día siguiente, realizar 3 lavados con 100 μ L de Tritón X- 100 al 1% cada 3 minutos.

9. **Adición del anticuerpo secundario.** Añadir de 4 a 5 gotas del anticuerpo secundario universal biotinilado (DAKO). Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
10. **Lavados.** Realizar 3 lavados con 100 μ L de Tritón X- 100 al 1 % cada 3 minutos.
11. **Estreptavidina.** Añadir 4 o 5 gotas de estreptavidina – HRP (DAKO) e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
12. **Lavados.** Realizar 3 lavados con 100 μ L de Tritón X- 100 al 1 % cada 3 minutos.
13. **Revelado de la reacción.** Añadir cromógeno DAB (dilución: 1 gota por mL) e incubar a temperatura ambiente hasta observar la tinción positiva. Observar constantemente al microscopio para poder detener la reacción sumergiendo la laminilla en un *copling* con PBS 1 x.
14. **Contratinción con hematoxilina.** Sumergir las laminillas en un *copling* con hematoxilina de 5 a 10 segundos. Lavar en agua destilada y virar en un baño maría durante 10 minutos aproximadamente.
15. **Montaje de las laminillas.** Realizar el tren de hidratación pero de manera inversa.

Sustancia	Tiempo
Etanol al 70 %	10 minutos
Etanol 95 %	10 minutos
Etanol 100 %	10 minutos
Xilol 2	10 minutos
Xilol 1	12 minutos

Adicionar a cada laminilla una gota de medio de montaje Entellan y colocar el cubreobjetos. Secar a temperatura ambiente.

12.1 OLIGONUCLEOTIDOS EMPLEADOS

12.1.1 Análisis de expresión

Nombre y función	Oligonucleótidos	Secuencia en DNA (5' – 3')	Tm (°C)	Tamaño esperado en cDNA	Tamaño esperado en DNA genómico
Expresión KDM4A	<i>KDM4A</i> FWD (Exón 20)	CGGCCAAGTCTATGGAGCC	62	177 pb	577 pb
	<i>KDM4A</i> RVS (Exón 22)	TCATTGAAGCGCATGTCTGAG	62		
Expresión GAPDH	<i>GAPDH</i> FWD (Exón 5)	TGCACCACCAACTGCTTAGC	62	95pb	95pb
	<i>GAPDH</i> RVS (Exón 5)	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	62		

12.1.2 ChIP

Oligonucleótidos	Secuencia en DNA (5' – 3')	Tm (°C)	Tamaño esperado en DNA genómico
CHD5 +741pb FWD	TCCCAAGCACTTTACCCG	64	236 pb
CHD5 +741pb RVS	AAGAACTGTCCCGCAAGG	64	

12.2 ANTICUERPOS UTILIZADOS

	Anti-KDM4A	Anti-CTCF	Anti-CHD5	Anti-H3K36me3
Origen	Ratón	Conejo	Conejo	Conejo
Marca	Abcam	Milipore	Santa Cruz	Diagenode
Numero de catalogo	ab105953	07-729	sc-68389	C15410058
Tipo	Monoclonal	Policlonal	Policlonal	Policlonal
Dilución IF	1:50	1:100	1:50	1:200
ChIP(μL)	5	2	----	4
	Anti-H3K36me2	Anti-H3K9me3	Anti-H3K9me2	IgG
Origen	Conejo	Conejo	Ratón	Conejo
Marca	Diagenode	Diagenode	Abcam	Diagenode
Numero de catalogo	CS-127-100	CS-056-100	ab-1220	kch-oneDIP-180
Tipo	Policlonal	Policlonal	Monoclonal	Policlonal
Dilución IF	1:100	1:100	1:50	
ChIP(μL)	5	1	3.7	2

Para las inmunofluorecencias se utilizó el anticuerpo secundario Alexa 488 de la marca Invitrogen con una dilución 1:200.

12.3 LÍNEAS CELULARES

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

Línea celular	Origen	Medio de cultivo
MCF 10A	Glándula mamaria, enfermedad fibroquística.	DMEM/F12 (3:1) adicionado con 10% de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 1x de amp/strepto, 10 ng/ml de EGFrh (factor de crecimiento epidérmico humano recombinante; Invitrogen), 120 mU/ml de insulina recombinante humana y 1 µg/ml de hidrocortisona.
MCF7	Efusión pleural, metástasis	RPMI con 10% SFB y 1% de amp/strepto.
MDA-MB-231	Efusión pleural, metástasis	RPMI con 10% SFB y 1% de amp/strepto.
HeLa	Adenocarcinoma de Cérvix	DMEM con 10% SFB y 1% de amp/strepto.

Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂. Amp/ strepto: ampicilina estreptomina.

13 REFERENCIAS

Agger, P.A. Cloos, J. Christensen, D. Pasini, S. Rose, J. Rappsilber, I. Issaeva, E. Canaani, A.E. Salcini, K. Helin, UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development, *Nature*, 449 (2007) 731-734.

Allis C.D., Berger S.L., Cote J., Dent S., Jenuwien T., Kouzarides T., Pillus L., Reinberg D., Shi Y., Shiekhata R. , Shilatifard A., Workman J., Zhang Y., New nomenclature for chromatin-modifying enzymes, *Cell*. 131(2007) 633-636.

Altucci, R. Addeo, L. Cicatiello, S. Dauvois, M.G. Parker, M. Truss, M. Beato, V. Sica, F. Bresciani, A. Weisz, 17beta-Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells, *Oncogene*. 12 (1996) 2315-2324.

Anand, R. Marmorstein, Structure and mechanism of lysine-specific demethylase enzymes. *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 35425-35429.

Angel, K. Hattori, T. Smeal, M. Karin, The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1, *Cell*. 55 (1988) 875-885.

Arrowsmith C.H., Bountra C., Fish P.V., Lee K., Schapira M., Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 11 (2012) 384-400.

Bagchi, C. Papazoglu, Y. Wu, D. Capurso, M. Brodt, D. Francis, M. Bredel, H. Vogel, A.A. Mills, CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36, *Cell*. 128 (2007) 459-475.

Bannister A.J., Schneider R., Kouzarides T., Histone methylation: dynamic or static? *Cell*. 109 (2002) 801-806.

Berry W.L., Shin S., Lightfoot S.A., Janknecht R., Oncogenic features of the JMJD2A histone demethylase in breast cancer, *Int. J. Oncol.* 41 (2012) 1701-1706.

Black J.C., Allen A., Van Rechem C., Forbes E., Longworth M., Tschöp K. C. Rinehart, Quiton J., Walsh R., Smallwood A., N.J. Dyson, Whetstine J.R., Conserved antagonism between JMJD2A/KDM4A and HP1 γ during cell cycle progression, *Mol. Cell.* 40 (2010) 736-748.

Black J.C., Manning A.L., Van Rechem C., Kim J., Ladd B., Cho J., Pineda C.M., Murphy N., Daniels D.L., Montagna C., Lewis P.W., Glass K., Allis C.D., Dyson N.J., Getz G., Whetstine J.R., KDM4A Lysine Demethylase Induces Site-Specific Copy Gain and Rereplication of Regions Amplified in Tumors, *Cell.* 154 (2013) 541-555.

Bourgo R.J., Siddiqui H., Fox S., Solomon D., Sansam C.G., Yaniv M., Muchardt C., Metzger D., Chambon P., Roberts C.W., Knudsen E.S, SWI/SNF deficiency results in aberrant chromatin organization, mitotic failure, and diminished proliferative capacity, *Mol. Biol. Cell.* 20 (2009) 3192-3199.

Byvoet, G.R. Shepherd, J.M. Hardin, B.J. Noland. The distribution and turnover of labeled methyl groups in histone fractions of cultured mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 148 (1972) 558–567.

Caiafa P., Zlatanova J. CCCTC-binding factor meets poly(ADP-ribose) polymerase-1, *J Cell Physiol.* 2 (2009) 265-270.

Caro E., Stroud H., Greenberg M.V., Bernatavichute Y.V., Feng S., Groth M., Vashisht A.A., Wohlschlegel J., Jacobsen S.E., The SET-domain protein SUV5 mediates H3K9me2 deposition and silencing at stimulus response genes in a DNA methylation-independent manner. *PLoS Genet.* 8 (2012) e1002995.

Chen Z., Zang J., Whetstine J., Hong X., Davrazou F., Kutateladze T.G., Simpson M., Mao Q., Pan C.H., Dai S., Hagman J., Hansen K., Shi Y., Zhang G., Structural insights into histone demethylation by JMJD2 family members, *Cell.* 125 (2006) 691–702.

Cicatiello L., Addeo R., Sasso A., Altucci L., Petrizzi V.B., Borgo R., Cancemi M., Caporali S., Caristi S., Scafoglio C., Teti D., Bresciani F., Perillo B., Weisz A., Estrogens and progesterone promote persistent CCND1 gene activation during G1 by inducing transcriptional derepression via c-Jun/c-Fos/estrogen receptor (progesterone receptor) complex assembly to a distal regulatory element and recruitment of cyclin D1 to its own gene promoter, *Mol. Cell. Biol.* 24 (2004) 7260-7274.

Cloos P.A., Christensen J., Agger K., Helin K., Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease, *Genes. Dev.* 22 (2008) 1115-40.

Couture J.F., Collazo E., Ortiz-Tello P.A., Brunzelle J.S., Trievel R.C., Specificity and mechanism of JMJD2A, a trimethyllysine-specific histone demethylase, *Nat. Struct. Mol. Bio.* 8 (2007) 689-695.

Crona, O. Dahlberg, L.E. Lundberg, J. Larsson, M. Mannervik, Gene regulation by the lysine demethylase KDM4A in *Drosophila*, *Dev. Biol.* 373 (2013) 453-463.

David, G.M. Turner, Y. Yao, A. Protopopov, R.A. Depinho, mSin3-associated protein, mSds3, is essential for pericentric heterochromatin formation and chromosome segregation in mammalian cells, *Genes. Dev.* 17 (2003) 2396-2405.

David, J.H. Dannenberg, N. Simpson, P.M. Finnerty, L. Miao, G.M. Turner, Z. Ding, R. Carrasco, R.A. Depinho, Haploinsufficiency of the mSds3 chromatin regulator promotes chromosomal instability and cancer only upon complete neutralization of p53, *Oncogene.* 25 (2006) 7354-7360.

Ding X., Pan H., Li J., Zhong Q., Chen X., Dry S.M., Wang C.Y., Epigenetic activation of AP1 promotes squamous cell carcinoma metastasis, *Sci. Signal.* 6 (2013) 1-13.

Felsenfeld G., Groudine M., Controlling the double helix, *Nature.* 421 (2003) 448-453.

Filippova G.N., Fagerlie S., Klenova E.M., Myers C., Dehner Y., Goodwin G., Neiman P.E., Collins S.J., Lobanenkov V.V., An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol Cell Biol* 16 (1996) 2802–2813.

Gonzalo, M. García-Cao, M.F. Fraga, G. Schotta, A.H. Peters, S.E. Cotter, R. Eguía, D.C. Dean, M. Esteller, T. Jenuwein, M.A. Blasco, Role of the RB1 family in stabilizing histone methylation at constitutive heterochromatin, *Nat. Cell. Biol.* 7 (2005) 420-428.

Gray S.G., Iglesias A.H., Lizcano F., Villanueva R., Camelo S., Jingu H., Teh B.T., Koibuchi N., Chin W.W., Kokkotou E., Dangond F., Functional characterization of JMJD2A, a histone deacetylase- and retinoblastoma-binding protein, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 28507-28518.

Hahn M.A., Wu X., Li A.X., Hahn T., Pfeifer G.P., Relationship between gene body DNA methylation and intragenic H3K9me3 and H3K36me3 chromatin marks. *PLoS One*.4 (2011) e18844.

Hausinger R.P., Feil/alpha-ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 39 (2004) 21-68.

Hou, H. Yu, Structural insights into histone lysine demethylation, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20 (2010) 739-748.

Huang Y., Fang J., Bedford M.T., Zhang Y., Xu R.M., Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A, *Science.* 312 (2006) 748-751.

Jeong Y.S., Park J.S., Ko Y., Kang Y.K. JHDM3A module as an effector molecule in guide-directed modification of target chromatin, *J Biol Chem.* 6 (2011) 4461-4470.

Jovanovic, J.A. Rønneberg, J. Tost, V. Kristensen, The epigenetics of breast cancer, *Mol. Oncol.* 4 (2010) 242-254.

Kauffman E.C., Robinson B.D., Downes M.J, Powell L.G., Lee M.M., Scherr D.S., Gudas L.J., Mongan N.P., Role of androgen receptor and associated lysine-demethylase coregulators, LSD1 and JMJD2A, in localized and advanced human bladder cancer, *Mol. Carcinog.* 50 (2011) 931-944.

Kelly W.G., Schaner C.E., Dernburg A.F., Lee M.H., Kim S.K., Villeneuve A.M., Reinke V., X-chromosome silencing in the germline of *C. elegans*. *Development.* 2 (2002) 479-492.

Kim S., Benoiton L., Paik W.K., Epsilon-alkyllysine. Purification and properties of the enzyme, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 3790-3796.

Kim T.D., Shin S., Berry W.L., Oh S., Janknecht R., The JMJD2A demethylase regulates apoptosis and proliferation in colon cancer cells, *J. Cell. Biochem.* 113 (2012) 1268-1276.

Kim, J. Daniel, A. Espejo, A. Lake, M. Krishna, L. Xia, Y. Zhang, M.T. Bedford, Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO Rep.* 7 (2006) 397-403.

Klose R.J., Yamane K., Bae Y., Zhang D., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Wong J., Zhang Y., The transcriptional repressor JHD3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature.* 42 (2006) 312-316.

Klose R.J., Zhang Y., Regulation of histone methylation by demethylase and demethylation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8 (2007) 307-318.

Kogure M, Takawa M, Cho HS, Toyokawa G, Hayashi K, Tsunoda T, Kobayashi T, Daigo Y, Sugiyama M, Atomi Y, Nakamura Y, Hamamoto R. Deregulation of the histone demethylase JMJD2A is involved in human carcinogenesis through regulation of the G(1)/S transition. *Cancer Lett.* 336 (2013) 76-84

Kooistra S.M., Helin K. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 13 (2012) 297-311.

Kouzarides, Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J.* 19 (2000) 1176–1179.

Kuroki S, Matoba S, Akiyoshi M, Matsumura Y, Miyachi H, Mise N, Abe K, Ogura A, Wilhelm D, Koopman P, Nozaki M, Kanai Y, Shinkai Y, Tachibana M. Epigenetic regulation of mouse sex determination by the histone demethylase *Jmjd1a*. *Science.* 341 (2013)1106-1109.

Lachner, D. O'Carroll, S. Rea, K. Mechtler, T. Jenuwein, Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature.* 410 (2001) 116-120.

Lan, P.E. Bayliss, J.L. Rinn, J.R. Whetstine, J.K. Wang, S. Chen, S. Iwase, R. Alpatov, I. Issaeva, E. Canaani, T.M. Roberts, H.Y. Chang, Y. Shi, A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development, *Nature.* 449 (2007) 689-694.

Lee J., Thompson J.R., Botuyan M.V., Mer G., Distinct binding modes specify the recognition of methylated histones H3K4 and H4K20 by JMJD2A-tudor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15 (2008) 109-111.

Lee M.G., Wynder C., Cooch N., Shiekhattar R., An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation, *Nature.* 437 (2005) 432-435.

Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. *Cell.* 128 (2007):707-719.

Li B.X., Luo C.L., Li H., Yang P., Zhang M.C., Xu H.M., Xu H.F., Shen Y.W., Xue A.M., Zhao Z.Q., Effects of siRNA-mediated knockdown of jumonji domain containing 2A on proliferation, migration and invasion of the human breast cancer cell line MCF-7, *Exp. Ther. Med.* 4 (2012) 755-761.

Li B.X., Luo C.L., Li H., Yang P., Zhang M.C., Xu H.M., Xu H.F., Shen Y.W., Xue A.M., Zhao Z.Q., Effects of RNA interference-mediated gene silencing of JMJD2A on human breast cancer cell line MDA-MB-231. *J. Exp. Clin. Cancer. Res.* (2011) 30:90.

Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 10 (2001) 1074-1080.

Li B.X., Luo C.L., Zhang M.C., Li H., Li L.L., Xu H.F., Shen Y.W., Xue A.M., Zhao Z.Q., Expression of JMJD2A in infiltrating duct carcinoma was markedly higher than fibroadenoma, and associated with expression of ARHI, p53 and ER in infiltrating duct carcinoma, *Indian. J. Exp. Biol.* 51 (2013) 208-217.

Lienert F., Mohn F., Tiwari V.K., Baubec T., Roloff T.C., Gaidatzis D., Stadler M.B., Schübeler D., Genomic prevalence of heterochromatic H3K9me2 and transcription do not discriminate pluripotent from terminally differentiated cells. *PLoS Genet.* 7 (2011) e1002090.

Livak K.J., Schmittgen T.D., Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25 (2001) 402-408.

Lobanenkova, V. V., Nicolas, R. H., Adler, V. V., Paterson, H., Klenova, E. M., Polotskaja, A. V., and Goodwin, G. H.. 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*, 5 (1990) 1743 – 1753

Loh Y.H., Zhang W., Chen X., George J., Ng H.H., Jmjd1a and Jmjd2c histone H3 Lys 9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells, *Genes. Dev.* 21 (2007) 2545-2557.

Lopez-Bergami P., Lau E., Ronai Z., Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer, *Nat. Rev. Cancer.* 10 (2010) 65-76.

Luger K., Hansen J.C., Nucleosome and chromatin fiber dynamics, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15 (2005) 188-196.

Lutz M., Burke L.J., Barreto G., Goeman F., Greb H., Arnold R., Schultheiss H., Brehm A., Kouzarides T., Lobanenkov V., Renkawitz R., Transcriptional repression by the insulator protein CTCF involves histone deacetylases, *Nucleic Acids Res.* 15 (2000) 1707-1713.

Mallette F.A., Richard S., JMJD2A promotes cellular transformation by blocking cellular senescence through transcriptional repression of the tumor suppressor CHD5, *Cell Rep.* 2 (2012) 1233-1243.

Méndez-Catalá C.F., Gretton S., Vostrov A., Pugacheva E., Farrar D., Ito Y., Docquier F, Kita GX, Murrell A, Lobanenkov V, Klenova E., A novel mechanism for CTCF in the epigenetic regulation of Bax in breast cancer cells, *Neoplasia*.15 (2013) 898-912.

Metzger E, Wissmann M, Yin N, Müller JM, Schneider R, Peters AH, Günther T, Buettner R, Schüle R. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature.* 437 (2005) 436-439

Mosammamaparast, Y. Shi. Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases, *Annu. Rev. Biochem.* 79 (2010) 155-179.

Mulero-Navarro S., Esteller M. Chromatin remodeling factor CHD5 is silenced by promoter CpG island hypermethylation in human cancer. *Epigenetics.* 4 (2008) 210-215.

Ohlsson, R., Renkawitz, R., and Lobanenkov, V.. CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends in Genetics,* 17 (2001) 520 – 527

Ozanne B.W., McGarry L., Spence H.J., Johnston I., Winnie J., Meagher L., Stapleton G., Transcriptional regulation of cell invasion: AP-1 regulation of a multigenic invasion programme, *Eur. J. Cancer.* 36 (2000) 1640-1648.

Paik W.K., Kim S., Enzymatic demethylation of calf thymus histones, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51 (1973) 781-788.

Paik W.K., Kim S., Epsilon-alkyllysine. New assay method, purification, and biological significance, *Arch. Biochem. Biophys.* 165 (1974) 369-378.

Patani N., Jiang W.G., Newbold R.F., Mokbel K., Histone-modifier gene expression profiles are associated with pathological and clinical outcomes in human breast cancer, *Anticancer Res.* 31 (2011) 4115-4125.

Patel D.J., Wang Z., Readout of epigenetic modifications, *Annu. Rev. Biochem.* 82 (2013) 81-118.

Peserico A, Simone C. Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. *J Biomed Biotechnol.* (2011) doi: 10.1155/2011/371832.

Peters A.H., O'Carroll D., Scherthan H., Mechtler K., Sauer S., Schofer C., Weipoltshammer K., Pagani M., Lachner M., Kohlmaier A., Opravil S., Doyle M., Sibilia M., Jenuwein, T., Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability, *Cell.* 107 (2001) 323-337.

Phillips, J. E., and Corces, V. G. 2009. CTCF: master weaver of the genome. *Cell*, 137: doi: 10.1016/j.cell.2009.06.001.

Rando OJ. Combinatorial complexity in chromatin structure and function: revisiting the histone code. *Curr Opin Genet Dev.* 2 (2012) 148-155.

Rea, F. Eisenhaber, D. O'Carroll, B.D. Strahl, Z.W. Sun, M. Schmid, S. Opravil, K. Mechtler, C.P. Ponting, C.D. Allis, T. Jenuwein. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature.* 406 (2000) 593-599.

Reinke V., Smith H.E., Nance J., Wang J., Van Doren C., Begley R., Jones S.J., Davis E.B., Scherer S., Ward S., Kim S.K., A global profile of germline gene expression in *C. elegans*, *Mol Cell*. (2000) 605-616.

Renaud S., Loukinov D., Bosman F.T., Lobanenkov V., Benhattar J., CTCF binds the proximal exonic region of hTERT and inhibits its transcription. *Nucleic Acids Res* 33 (2005) 6850–6860.

Reuben M., Lin R., Germline X chromosomes exhibit contrasting patterns of histone H3 methylation in *Caenorhabditis elegans*, *Dev. Biol.* 245 (2002) 71-82.

Schneider J., Shilatifard A., Histone demethylation by hydroxylation: chemistry in action, *ACS. Chem. Biol.* 1 (2006) 75-81.

Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88 (1997). 593–602.

Shi Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstine J.R., Cole P.A., Casero R.A., Shi Y., Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1, *Cell*. 119 (2004) 941-953.

Shi Y., Whetstine J.R., Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases, *Mol. Cell*. 25 (2007) 1-14.

Shin S., Janknecht R., Activation of androgen receptor by histone demethylases JMJD2A and JMJD2D, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359 (2007) 742-746.

Slee R.B., Steiner C.M., Herbert B.S., Vance G.H., Hickey R.J., Schwarz T., Christan S., Radovich M., Schneider B.P., Schindelbauer D., Grimes B.R., Cancer-associated alteration of pericentromeric heterochromatin may contribute to chromosome instability, *Oncogene*. 31 (2012) 3244-3253.

Sun S., Del Rosario B.C., Szanto A., Ogawa Y., Jeon Y., Lee J.T., Jpx RNA activates Xist by evicting CTCF. *Cell*.153(2013)1537-1551.

Thompson P.M., Gotoh T., Kok M., White P.S., Brodeur G.M., CHD5, a new member of the chromodomain gene family, is preferentially expressed in the nervous system, *Oncogene*. 22 (2003) 1002-1011

Torrano V, Navascués J, Docquier F, Zhang R, Burke LJ, Chernukhin I, Farrar D, León J, Berciano MT, Renkawitz R, Klenova E, Lafarga M, Delgado MD, Targeting of CTCF to the nucleolus inhibits nucleolar transcription through a poly(ADP-ribose)ation-dependent mechanism. *J Cell Sci*. 1 (2006) 1746-1759.

Travers AA, Vaillant C, Arneodo A, Muskhelishvili G, DNA structure, nucleosome placement and chromatin remodelling: a perspective. *Biochem Soc Trans*. 40 (2012) 335-340.

Vavouri T., Lehner B. Human genes with CpG island promoters have a distinct transcription-associated chromatin organization. 27 (2012) 27;13(11)

Verrier L., Escaffit F., Chailleux C., Trouche D., Vandromme M., A new isoform of the histone demethylase JMJD2A/KDM4A is required for skeletal muscle differentiation, *PLoS Genet*. 7 (2011):e1001390.

Whetstine J. R., Nottke A., Lan F., Huarte M., Smolikov S., Chen Z., Spooner E., Li E., Zhang G., Colaiacovo M., Shi Y., Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases, *Cell* 125 (2006) 467-481.

Wu X, Zhu Z, Li W, Fu X, Su D, Fu L, Zhang Z, Luo A, Sun X, Fu L, Dong JT. Chromodomain helicase DNA binding protein 5 plays a tumor suppressor role in human breast cancer. *Breast Cancer Res*. 8 (2012) 8-14

Yamane K., Toumazou C., Tsukada Y.I., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Wong J., Zhang Y., JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor, *Cell*. 125 (2006) 483-495.

Zhang, H.G. Yoon, J. Wong, JMJD2A is a novel N-CoR-interacting protein and is involved in repression of the human transcription factor achaete scute-like homologue 2 (ASCL2/Hash2), *Mol. Cell. Biol*. 25 (2005) 6404-6414.